

(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2004-509602

(P2004-509602A)

(43) 公表日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00		4 B O 2 4	
A 6 1 K 31/7088		A 6 1 K 31/7088		4 B O 6 3	
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395		D	
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395		N	
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00		4 C O 8 4	
				4 C O 8 5	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 259 頁)	
				最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2001-545550 (P2001-545550)		(71) 出願人 500056297			
(86) (22) 出願日 平成12年12月14日 (2000.12.14)		キュラジェン コーポレイション			
(85) 翻訳文提出日 平成14年6月14日 (2002.6.14)		アメリカ合衆国 コネチカット州		0 6 5	
(86) 国際出願番号 PCT/US2000/033909		1 1 ニュー ヘイブン ロング ウォー			
(87) 国際公開番号 WO2001/044473		フ ドライブ 5 5 5			
(87) 国際公開日 平成13年6月21日 (2001.6.21)		(74) 代理人 100078282			
(31) 優先権主張番号 60/170,564		弁理士 山本 秀策			
(32) 優先日 平成11年12月14日 (1999.12.14)		(74) 代理人 100062409			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		弁理士 安村 高明			
(31) 優先権主張番号 60/173,165		(74) 代理人 100113413			
(32) 優先日 平成11年12月27日 (1999.12.27)		弁理士 森下 夏樹			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		(72) 発明者 スパデルナ, スティーブン ケイ.			
(31) 優先権主張番号 60/173,362		アメリカ合衆国 コネチカット		0 6 0 3	
(32) 優先日 平成11年12月27日 (1999.12.27)		7, ベルリン, ディアフィールド ド			
(33) 優先権主張国 米国 (US)		ライブ 2 6 1			
				最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ポリペプチド、およびそれをコードする核酸

(57) 【要約】

本発明は、新規な単離されたMEMXポリヌクレオチドおよびこのMEMXポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを提供する。MEMXポリペプチド、またはMEMXポリペプチド、ポリヌクレオチド、もしくは抗体の任意の誘導体、改変体、変異体、もしくはフラグメントに免疫特異的に結合する抗体もまた提供される。本発明は、さらに、MEMXポリペプチド、ポリヌクレオチド、および抗体が、広範な病理状態の検出および処置において、ならびに他の用途において使用される方法を提供する。

MEMX POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES
The present invention provides novel isolated MEMX polynucleotides and polypeptides encoded by these MEMX polynucleotides. The MEMX polypeptides, or derivatives, modified forms, variants, or fragments of the MEMX polypeptides, or antibodies that specifically bind to the MEMX polypeptides, or fragments thereof, are also provided. The present invention further provides methods of using MEMX polypeptides, polynucleotides, and antibodies for the detection and treatment of a wide range of pathological conditions, as well as for other uses.

MEMX POLYNUCLEOTIDES AND POLYPEPTIDES
The present invention provides novel isolated MEMX polynucleotides and polypeptides encoded by these MEMX polynucleotides. The MEMX polypeptides, or derivatives, modified forms, variants, or fragments of the MEMX polypeptides, or antibodies that specifically bind to the MEMX polypeptides, or fragments thereof, are also provided. The present invention further provides methods of using MEMX polypeptides, polynucleotides, and antibodies for the detection and treatment of a wide range of pathological conditions, as well as for other uses.

【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、4、6、8、10、12、14、または 16 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、4、6、8、10、12、14、または 16 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、該成熟形態における任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸配列に変化しており、ただし、該成熟形態の配列のうちの 20 % 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
 - (c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 からなる群より選択されるアミノ酸配列；
 - (d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 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、ここで選択された配列に示される任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該配列のうちの 20 % 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；ならびに
 - (e) (a) ~ (d) のいずれかのフラグメント、
- 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、4、6、8、10、12、14、または 16 からなる群より選択される配列の天然に存在する対立遺伝子改変体である、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、単一ヌクレオチド多型 (SNP) の翻訳産物である、ポリペプチド。

【請求項 4】

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、は、本明細書中で記載される改変体ポリペプチドであり、ここで、前記選択された配列に示される任意のアミノ酸が、保存的置換を提供するよう変化される、ポリペプチド。

【請求項 5】

単離された核酸分子であって、該核酸分子が、以下：

- (a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 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、4、6、8、10、12、14、または 16 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、選択された配列の該成熟形態における任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該成熟形態の配列のうちの 20 % 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
 - (c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 からなる群より選択されるアミノ酸配列；
 - (d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 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、該選択された配列に示される任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該配列のうちの 20 % 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
 - (e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14、または 16 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任意の改変体の、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、該選択された配列の任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該配列のうちの 10 % 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、核酸フラグメント；ならびに
 - (f) 該核酸分子のいずれかの相補体、
- 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】

改変体ポリペプチドをコードする、請求項 5 に記載の核酸分子であって、ここで、該改変体ポリペプチドが、天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を有する、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、前記改変体ポリペプチドをコードする単一ヌクレオチド多型を含む、核酸分子。

10

【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、3、5、7、9、11、13、または 15 からなる群より選択されるヌクレオチド配列；

(b) ヌクレオチド配列であって、ここで、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、または 15 からなる群より選択されるヌクレオチド配列における 1 つ以上のヌクレオチドが、該選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化しており、ただし、20 % 以下のヌクレオチドが、このように変化している、ヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13、または 15 からなる群より選択される配列の核酸フラグメント；ならびに

20

(d) 核酸フラグメントであって、ここで、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、または 15 からなる群より選択されるヌクレオチド配列における 1 つ以上のヌクレオチドが、該選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化しており、ただし、20 % 以下のヌクレオチドが、このように変化している、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、3、5、7、9、11、13、または 15 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体に、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。

30

【請求項 11】

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、前記選択されたヌクレオチド配列のコード配列に示される任意のヌクレオチドが、該選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化しており、ただし、該選択されたコード配列におけるヌクレオチドの 20 % 以下がこのように変化している、ヌクレオチド配列、該第一のポリヌクレオチドの相補体である単離された第二のポリヌクレオチド、またはこれらのいずれかのフラグメントを含む、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。

40

【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】

50

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決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に導入する工程；および
 - (c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定して、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決定する工程、
- 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決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に導入する工程；および
 - (c) 該核酸分子に結合した該プローブの存在または量を決定して、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決定する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 20】

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に導入する工程；および
 - (b) 該因子が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 21】

病状を処置する際に使用するための潜在的な治療剤を同定するための方法であって、ここで、該病状が、請求項 1 に記載のポリペプチドの異常な発現または異常な生理学的相互作用に関連しており、該方法が、以下：

- (a) 請求項 1 に記載のポリペプチドを発現し、かつ該ポリペプチドに起因する特性または機能を有する、細胞を提供する工程；

(b) 該細胞を、候補物質を含む組成物と接触させる工程；および
該物質が該ポリペプチドに起因し得る特性または機能を変化させるか否かを決定し、これによって、該物質の存在下で観察される変化が、該細胞を該物質を欠く組成物と接触させる際には観察されない場合には、該物質は、潜在的な治療剤として同定される、工程
を包含する、方法。

【請求項 22】

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に十分な量の該ポリペプチドに結合する化合物に導入する工程を包含する、方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状を処置または予防する方法であって、該方法は、そのような処置または予防が所望される被験体に、該被験体における該病状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 24】

前記被験体がヒトである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状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、該被験体における該病状を処置または予防するに十分な量で MEMX 核酸を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

前記被験体がヒトである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状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、該被験体における該病状を処置または予防するに十分な量で MEMX 抗体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 15 に記載の方法。

【請求項 29】

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。

10

【請求項 30】

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 31】

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 32】

請求項 29 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 33】

請求項 30 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 34】

20

請求項 31 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 35】

ヒト疾患に関連する症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状から選択され、ここで該治療剤は、請求項 1 に記載のポリペプチドである、使用。

【請求項 36】

ヒト疾患に関連する症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状から選択され、ここで該治療剤は、MEMX 核酸である、使用。

【請求項 37】

30

ヒト疾患に関連する症候群を処置するための医薬の製造における治療剤の使用であって、該疾患は、請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状から選択され、ここで該治療剤は、MEMX 抗体である、使用。

【請求項 38】

請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状の活性または潜伏性または該病状に対する素因のモジュレーター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) 請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状に対する危険性が増加した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

40

(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に対する該試験動物中の該ポリペプチドの活性における変化は、該試験化合物が請求項 1 に記載のポリペプチドと関連する病状の潜伏性のまたは病状に対する素因のモジュレーターであることを示す、工程、

を包含する、方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、試験タンパク質導入遺伝子を発現するか、または野生型試験動物に対して増加したレベルで、プロモーターの制御下

50

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 40】

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素因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やすいわけではないことが既知の、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素因を示す、工程を包含する、方法。

10

【請求項 41】

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素因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やすいわけではないことが既知の、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素因を示す、工程を包含する、方法。

20

【請求項 42】

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、該病理学的状態を緩和するの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、4、6、8、10、12、14、もしくは16またはそれらの生物学的に活性なフラグメント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に少なくとも20%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 43】

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の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。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、核酸およびその核酸により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、膜結合ポリペプチドまたは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】

(発明の背景)

(7回膜貫通レセプター)

7回膜貫通タンパク質は、膜固定を容易にするように働き（例えば、M u e l l e r , 2000. Curr. Med. Chem. 7: 861~888を参照のこと）、そして低分子量リガンドへの結合部位に適応すると考えられる、ほとんど疎水性の残基を含む、7つのαらせんを有する膜貫通タンパク質である。

【0003】

最もよく特徴づけされた7回膜貫通レセプタータンパク質は、グアニンヌクレオチド結合シグナル伝達タンパク質（G-プロテイン）-結合レセプター（G u a n i n e n u c l e o t i d e - b i n d i n g s i g n a l - t r a n s d u c i n g p r o t

40

50

ein (G-protein)-coupled receptor (GPCR) である。これは、細胞内Gタンパク質の活性化化合物によって細胞質膜を通じて化学シグナルを伝達する。例えば、WatsonおよびArkinstall、THE G-PROTEIN LINKED RECEPTORS、Academic Press, San Diego, CA, 1994第1～294頁を参照のこと。さらに、GPCRは、生体医学リサーチにおいて確証された薬物標的の最も顕著なファミリーを構成する。なぜなら、全ての承認された薬物の約60%がこのタンパク質のファミリーのメンバーを選択的に相互作用することによってその治療効果を発揮し、そして疾患状態の宿主において治療介入のための重要な分子標的として働くからである。

【0004】

GPCRは、広範な種々の生物学的プロセス（例えば、神経伝達、化学遊走性、心臓機能、嗅覚、および視覚）の活性を調節する細胞外シグナルを伝達する。数百のGPCRが、広範な種々の刺激（光子、神経伝達物質、および種々の分子構造のホルモン）に応答してこれらのGタンパク質の1つ以上を通じてシグナル伝達する。GPCRは、グアニンヌクレオチド結合シグナル伝達タンパク質（Gプロテイン）（これは、GTP結合状態で、下流の膜局在化エフェクターに結合しそして活性化する）の活性を通じてその細胞内作用を媒介する、調節性GTPaseの多様なファミリーとして機能する。この機構（これによって、これらのリガンドはレセプター／Gプロテイン系の活性化を誘発する）は、非常に複雑であり、そして多面的である。GPCRの顕著なメンバーとしては、例えば、アンジオテンシンII、CCK／ガストリン、インターロイキン8、エンドセリンなどが挙げられる。例えば、van Neuren, 1999, J. Recept. Signal Transduct. Res. 9: 341～353を参照のこと。

【0005】

GPCRスーパーファミリーは、進化的に保存されており、そして細胞外アミノ末端および細胞質カルボキシ末端を有する、推定7回膜貫通（TM）ドメインを有することによって構造的に特徴付けられる。GPCRは、7回の独立した折り畳みユニットからなり、このユニットは、緊密にパックされたコアを有するタル状（barrel-like）構造にアレンジされた膜貫通ドメインを有する。GPCRによる、保存された7-TM構造のユニバーサル適応（結果として、TMコアにそって3つの細胞内ループおよび3つの細胞外ループを付与する）は、一般に、その構造的安定性および機能的多様性を達成することが最低限必要であると考えられている。今日まで、原核生物および真核生物で同定されたほぼ2,000のGPCRはどれも、7TMドメインより少なくしか含まないことが公知である。

【0006】

最近の研究では、一次配列の整列（アラインメント）は、GPCR膜貫通領域との高い程度の相同性を実証した。テンプレートとしてバクテリオロドプシンの精密なモデルを用いて、39GPCRの3次元（3Dモデル）を作成した。5つの陽イオン性神経伝達物質レセプター（すなわち、セロトニン作動性5-HT₂、ドーパミン作動性D₂、ムスカリン作動性m₂、アドレナリン作動性α₂、およびβレセプター）をプロトタイプとして採用し、詳細に研究した。陽イオン性神経伝達物質レセプターの3Dモデルは、その一次構造比較とともに、このアゴニスト結合部位がレセプターの細胞外表面付近に配置されていること、および膜にまたがるヘリックス（らせん）3、4、5、6、および7の残基を含むことを示す。この結合部位は、膜貫通らせん3の真ん中に位置する陰性に荷電されたAsp、ならびにらせん4、5、6および7上に保存された芳香族残基を含む疎水性ポケットからなる。さらに、全てのGPCRは、不変のヒンジ残基を保有することが示されている。この残基は、アゴニスト結合の間の高次構造（コンフォメーション）変化の原因であり従ってレセプターに対するGプロテインの解離および会合に影響すると考えられる。Gプロテインの結合の調節は、疎水性相互作用および水素結合を介する、この領域内の高次構造変化に起因する。細胞外で生じるレセプターリガンド認識事象の情報は、細胞内区画に対するGPCRの膜貫通部分内の高次構造の再配列を通じて移動される。従って、GPC

10

20

30

40

50

Rは、細胞の外部と細胞の細胞質との間の機能的かつ1方向性（単方向性）の連絡を確立する。

【0007】

一般に、GPCR活性には、直後に反応性の消失（脱感作と呼ばれる）が続き、次いで回復または再感作の期間が続く。シグナル伝達電位におけるこれらの変化は、GPCRリン酸化および細胞内の異なる位置への輸送を含む機構を主に介して、厳密に調節されている。

【0008】

（グルタミン酸およびアスパラギン酸レセプター）

グルタミン酸およびアスパラギン酸レセプターは、中枢神経系（CNS）に豊富であり、イオンチャネル型応答および代謝調節型応答の両方による応答を誘発する。代謝調節型反応クラスに含まれるのはグルタミン酸レセプターである。グルタミン酸レセプターは、一般に7つの単鎖膜貫通タンパク質（seven, single-chain transmembrane-spanning protein）からなる。代謝調節レセプターおよびN-メチル-D-アスパラギン酸のイオンチャネル型レセプターをコードする多くのcDNAが、近年同定されている。選択的スプライシングのプロセスの結果として、およびmRNAの単一塩基編集によってさえ、多様なレセプター型が顕著に増大していることがまた示されている。例えば、GilmanおよびGoodman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、第9版、Hardman, JGら（編）、McGraw-Hill、New York, 1996、第278～282頁を参照のこと。

【0009】

近年、精神分裂病の病態生理学においてグルタミン酸レセプターの役割を検討するのが関心事である。実際、精神分裂病のドーパミン仮説理論は、精神分裂病の陽性症状しか説明できない。一方、グルタミン酸仮説は、この病態のより包括的な視点を提供する。Noorbataら（Piracetam in the treatment of schizophrenia: implications for the glutamate hypothesis of schizophrenia. PMID: 10583700）は、ハロペリドールとピラセタム（グルタミン酸レセプターを陽性に調節する向知性の因子）の組み合わせが、この疾患を処置するのに、ハロペリドール単独よりも効果的であるか否かを検討するための臨床試験を行った。彼らは、精神分裂病のDSM-IV基準に適合する30例の患者を試験した。患者を無作為の様式に割り当て、14例には、ハロペリドール（30mg/日）およびピラセタム（3200mg/日）の両方を投与し、16例の患者には、ハロペリドール（30mg/日）およびプラセボのみを投与した。両方のプロトコールは、臨床試験の期間にわたって、陽性症状、陰性症状、一般的病態生理学的症状のスコア、およびPANSSスケールの総スコアを有意に低下させたことが見出された。それにもかかわらず、これらの研究者はまた、ハロペリドールおよびピラセタムの併用が、精神分裂病患者の処置において、ハロペリドール単独を上回る有意な優位性を示したことを実証した。彼らは、ピラセタム、多数の向知性クラスの薬物およびグルタミン酸レセプターの陽性の調節因子が、代表的な神経遮断薬（神経弛緩薬）との併用で、精神分裂病患者の処置に治療的に利点であり得ると結論した。

【0010】

頭部外傷後に放出された興奮性アミノ酸の過剰な活性はまた、動物モデルおよびヒトでの研究において、進行性の傷害に寄与することが実証されている。例えば、Morrisら、1999. J. Neurosurg 91（5）：737～743を参照のこと。グルタミン酸レセプターに対するアンタゴニストとして作用するいくつかの薬学的因子が、この進行の制限において見込まれている。N-メチル-D-アスパラギン酸レセプターアンタゴニストセルフテル（Selfotel）（CGS 19755）の有効性を、重篤な頭部傷害患者の2つの平行した研究において評価した。この研究では、重篤な頭部外傷とは、蘇生後グラスゴーコーマスケールのスコアが4～8と規定した。しかし、セルフ

テル (Selfotel) の臨床試験は、患者の幾人かでの重篤な副作用によって、完了前に終わった。この臨床試験の結果は、脳におけるグルタミン酸レセプターの特性のより良好な理解の必要性、ならびにこのレセプターのより効果的なアゴニストおよびアンタゴニストを発見する必要性を実証する。

【0011】

(カリウムチャネル)

カリウムチャネルは、興奮性膜の電位依存性カリウムイオン透過性を媒介する。このタンパク質が、膜を横切る電位差に応答して開放コンフォメーション (高次構造) または閉鎖コンフォメーションのどちらを想定するかに依存して、このタンパク質は、カリウム選択性チャネルを形成し、これを通じてカリウムイオンはその電気化学的勾配にそって通過し得る。

10

【0012】

カリウムチャネルは、統合型 (組み込み型) 膜タンパク質であることが示されている。s4セグメントは、おそらく電圧センサーであり、そしてあらゆる第3位置で、一連の陽性に荷電したアミノ酸によって特徴付けられる。さらに、このテールは、特異的細胞内区画に対するこのチャネルの活性および/またはこのチャネルの標的化の調節において重要であり得る。このチャネルタンパク質は、遅延型整流クラスに属し、そしてショー (Shaw) カリウムチャネルサブファミリーに属する。

【0013】

IKr (カリウムイオンチャネル、迅速応答) 遮断 (ブロック) は、急性心筋虚血と上昇した交感神経活性との間の相互作用によって誘発された心室性細動を予防するのには効果がない。これは、部分的には、アドレナリン作動性活性が、IKrブロック (遮断) の50%より大きい活性電位延長効果を相殺し、従って作用の一次機構を損なうという事実に依存する。遅延型整流カリウムチャネル (IKr) の即時型成分のブロックと比較的弱いβアドレナリン作動性遮断 (ブロック) とを合わせる、新規な抗不整脈剤であるエルセンチリド (ersentilide) (CK-3579) の抗細動性効果を、致死的不整脈の意識下イヌモデルで試験した。Admsonら、1998、Cardiovascular Res. 40 (1): 56~63を参照のこと。最大トレッドミル運動の間、2分間の回旋動脈閉塞 (CAO) を受けている、治癒した心筋梗塞 (MI) を有する19匹のイヌで、エルセンチリド (ersentilide) を試験した。一定ペースの心拍で、左星形神経節の刺激の間およびベースラインで、8匹の麻酔下開胸イヌにおいて、エルセンチリドの前および後に、心外膜単相性作用電位期間 (epicardial monophasic action potential duration) を測定した。コントロールの試験では、運動試験および虚血試験の間、19匹のイヌのうち13匹が心室性細動 (VF) を有したが、6匹は有さなかった。引き続く運動試験の間、高リスク動物のうち82% (13匹のうち11匹) でエルセンチリドは、VFを防止し、そして最初の試験で、不整脈なしの6匹のイヌでは不整脈促進 (pro-arrhythmic) 効果を示さなかった。エルセンチリドは、運動の全てのレベルにおいて、そして急性心筋虚血の間、心拍数を低下させた。抗細動性効果は、心房ペーシングによってコントロールレベルに心拍数を維持した4匹のイヌのうち3匹で維持された。エルセンチリドはまた、360ms長の周期で30%まで ($179 \pm 6 \text{ ms} \sim 233 \pm 5 \text{ ms}$, $p < 0.001$) 左心室性単相作用電位期間 (monophasic action potential duration) を延長し、そして交感神経刺激の間のその期間の短縮を妨げることが見出された。従って、これらの著者らは、エルセンチリドを用いた、IKrおよび弱いβアドレナリン作動性ブロックの組み合わせが、非常に効果的であり、そして安全な抗不整脈介入であって、どのような抗アドレナリン作動性効果の薬物がないことにおける限界をも克服し得ると結論した。このような組み合わせは、不整脈の危険性が高い、心筋梗塞後患者の管理において非常に有用であり得る。

20

30

40

【0014】

NairおよびGrant (1997, Cardiovascular Drugs T

50

her. 11 (2) : 149-167) は、抗不整脈薬を概説する。低い副作用プロフィールを維持しながら悪性心室不整脈に対して効果的な抗不整脈剤を開発することの最終目的は、つかみ所がないままとして評価された。この研究において、クラス III 薬物、アミオダロンおよびソタロールは、最良の利用可能な薬剤とみなされた。しかし、両薬物は、純粋なクラス III の効果の範囲以外の特性を保持し、そしてこれらの使用は、種々の用量関連副作用によって限定される。現在開発中であるより選択的なクラス III 特性を有するいくつかの薬物が、存在する。

【0015】

Nair および Grant (1997) による上述の概説には、最適な特徴である有効な理論クラス III 薬物に関する概観、および活発な調査の下にある多数のクラス III 薬物の特性に関する要旨が提供される。内曲不整脈に対する理想的なクラス III 抗不整脈剤は、遅延した発症および急速なオフセットの動力学を伴う用量依存の延長の作用ポテンシャル期間を提供するべきである。この薬物は、遅延した作用の発症、および生理学的心臓速度の回復に対するその効果の急速な分解を伴って、心室頻脈または細動の間に達成される急速な心臓速度で、選択的に心臓組織の難治性期間を延長する。正常または遅延した心臓速度での難治性期間に対する影響をほとんど伴わずに、トルサード・ド・ポアントを誘導する能力は減少される。これらの理想的な特性と対照的に、最近利用可能な治験薬は、作用ポテンシャル期間に対して逆の用量依存効果を有し、より遅延した心臓速度で難治性期間に最も効果を与える。この特性は、ある部分、遅延した整流カリウムチャンネル (rectifier potassium channel) (IKr) の急速に活性化している成分の優先的なブロックから生じ、ゆっくりと活性化する成分 (IK) にほとんどまたは全く影響を与えない。IK を選択的にブロックする好ましいブロック動力学を有する薬物の開発は、有効な抗不整脈特性を維持しながら、より低い前不整脈事象 (proarrhythmic event) を引き起こし得る。

【0016】

(タンパク質ホスファターゼ I)

タンパク質ホスファターゼ 1 は、グリコーゲン代謝における重要な酵素（これには、ホスホリラーゼ b、グリコーゲンシンターゼおよびホスホリラーゼキナーゼが挙げられる）の局在のための足場として作用すると考えられる。この酵素は、インスリン感受性組織に優先的に発現され、そしてインタクトな細胞におけるグリコーゲン蓄積のホルモンコントロールを媒介することが見出された。

【0017】

肝臓グリコーゲン合成は、インスリン依存性糖尿病ラットおよび副腎摘出された飢餓ラットにおいて損傷しており、そしてこれがグリコーゲンシンターゼホスファターゼによるグリコーゲンシンターゼの不完全な活性化に起因することが公知であるが、根本的な分子機構は、描かれていない。グリコーゲンシンターゼホスファターゼは、肝臓グリコーゲン結合サブユニット (GL と呼ばれる) と複合体化したタンパク質ホスファターゼ 1 (PP1) の触媒サブユニットを含む。インスリン依存性糖尿病ラットおよび副腎摘出された飢餓ラットの肝臓抽出物において、GL レベルは、免疫ブロッティングによって、コントロール抽出物のレベルと比較して実質的に減少されたことが示されたが、一方、PP1 触媒サブユニットのレベルは、これらの処置によって影響されなかった。Doherty ら、1998、Biochem. J. 333 : 253-257 を参照のこと。糖尿病マウスへのインスリン投与は、GL レベルを回復させ、そして延長投与は、このレベルをコントロールレベルよりも上昇させ、一方、再給餌は、副腎摘出された飢餓ラットにおける GL レベルを部分的に回復させた。インスリンおよび飢餓／給餌による GL タンパク質レベルの調節は、GL mRNA レベルにおける変化と相関することが示され、これは、インスリンによる肝臓グリコーゲン関連形態の PP1 の長期調節、故に肝臓グリコーゲンシンターゼの活性が、主に GL mRNA レベルの変化を介して媒介されることを示す (PMID : 9657963、UI : 98324884)。

【0018】

10

20

30

40

50

(レチノール結合タンパク質)

レチノール結合タンパク質 (RBP) は、血液中のレチノール (ビタミンA1) の特定のキャリアである。血液中の低いRBPレベルは、角膜軟化症患者中の低い血清レチノールレベルと関連することが見出された。家族性ハイポーRBP蛋白血症は、良好な栄養にもかかわらず、はしか感染の間に発端者の子供を角膜軟化症にかかりやすくすることが見出された。例えば、Attard-Montaltoらは、掌、足の裏、および顔に間欠性オレンジ変色を有し、そしてビタミンAおよび血清特異的レチノール結合タンパク質の両方の持続した低いレベルと関連するカロチン血症を有する少女を記載する。これらの著者らは、低い血清レチノール結合タンパク質濃度が、肝臓によるビタミンAの遅延した取り込みおよび放出を引き起こすと仮定した。カロチンのビタミンAへの変換は、結果的に阻害され、そしてこれが、過剰カロチン血症を引き起こす。ビタミンA補給は、血清ビタミンA濃度を上昇し得ず、そしてカロチン血症を軽減しなかった。

10

【0019】

Seeligerらは、レチノール結合タンパク質合成の遺伝性欠損に起因した、レチノール欠損における目の表現型を報告した。2人の冒された姉妹 (年齢17歳および13歳) は、RBP4遺伝子におけるミスセンス変異に関して複合ヘテロ接合体であった。この冒された姉妹の各々は、幼少初期から夜間視力の問題を有していたが、そうでなければ良好であった。視力は、17歳では20/40にそして13歳では20/25にわずかに減少した。この冒された姉妹の各々は、検出可能な血清RBPおよび正常なレチニルエステルを有さず、レチノールレベルは、正常の20%未満であった。

20

【0020】

RBP遺伝子は、第10染色体の長いアームにマップされ、そしてウシβラクトグロブリンと相同である。

【0021】

(発明の要旨)

本発明は、一部、新規ポリペプチドをコードする新規ポリヌクレオチド配列の発見に基づく。これらのポリペプチドをコードする核酸、ならびにその誘導体およびフラグメントは、本明細書中以後に、集合的に「MEMX」として示される。

【0022】

従って、1つの局面において、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15の配列、またはこれらのフラグメント、ホモログ、アナログ、もしくは誘導体を含む、単離された核酸分子を提供する。この核酸分子としては、例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも80%同一であるポリペプチドをコードする核酸配列が挙げられ得る。この核酸は、例えば、ゲノムDNAフラグメント、またはcDNA分子であり得る。

30

【0023】

本明細書中に記載される1つ以上の核酸を含むベクター、および本明細書中に記載されるベクターまたは核酸を含む細胞が、本発明にまた、含まれる。

【0024】

本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかを含むベクターで形質転換された宿主細胞に関する。

40

【0025】

別の局面において、本発明は、MEMX核酸および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

【0026】

さらなる局面において、本発明は、実質的に精製されたMEMXポリペプチド (例えば、MEMX核酸によってコードされる任意のMEMXポリペプチド、ならびにそのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体) を含む。本発明はまた、MEMXポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。

【0027】

50

なおさらなる局面において、本発明は、MEMXポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。この抗体は、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、ならびにこれらのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体であり得る。本発明はまた、MEMX抗体および薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤を含む薬学的組成物を含む。本発明はまた、上記の核酸分子のいずれかによってコードされるポリペプチド上のエピトープに結合する単離された抗体に関する。

【0028】

本発明はまた、上記の薬学的組成物のいずれかを含むキットを含む。

【0029】

本発明はさらに、MEMX核酸（例えば、MEMX核酸を含むベクター）を含む細胞を提供する工程、およびこの核酸によってコードされるMEMXポリペプチドを発現するのに十分な条件下で細胞を培養する工程によって、MEMXポリペプチドを産生する方法を提供する。この発現されたMEMXポリペプチドは、次いで、細胞から収集される。好ましくは、この細胞は、内在性MEMXポリペプチドをほとんどまたは全く産生しない。この細胞は、例えば、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

10

【0030】

本発明はまた、サンプル中のMEMXポリペプチドまたは核酸を、そのサンプルを、そのポリペプチドもしくは核酸に特異的に結合する化合物と接触させること、およびもし存在すれば、複合体の形成を検出することによって同定する方法に関する。

【0031】

本発明はさらに、MEMXポリペプチドを化合物と接触させ、そしてそのMEMXポリペプチドの活性が改変されたか否かを決定することによって、MEMXポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する方法を提供する。

20

【0032】

本発明はまた、MEMXポリペプチドをその化合物と接触させ、そしてその化合物がMEMXポリペプチドの活性を調節するか、MEMXポリペプチドに結合するか、それともMEMXポリペプチドをコードする核酸分子に結合するか決定することによって同定したMEMXポリペプチド活性を調節する化合物に関する。

【0033】

別の局面において、本発明は、被験体において、MEMX関連障害の存在またはMEMX関連障害に対する素因を決定する方法を提供する。その方法は、その被験体からのサンプルを提供する工程、およびその被験体サンプルにおけるMEMXポリペプチドの量を測定する工程を包含する。その被験体のサンプルにおけるMEMXポリペプチドの量は、次いで、コントロールサンプル中のMEMXポリペプチドの量と比較される。その被験体タンパク質サンプル中のMEMXポリペプチドの量における、コントロールタンパク質サンプル中のMEMXポリペプチドの量に比較しての変更は、その被験体が、組織増殖関連状態を有することを示す。コントロールサンプルは、好ましくは、整合した個体（すなわち、同様の年齢、性、その他の一般的条件の個体であるが、組織増殖関連状態を有すると疑われていない個体）から得られる。あるいは、そのコントロールサンプルは、その被験体が組織増殖関連状態を有すると疑われないときの時点で、被験体から得られ得る。いくつかの実施形態において、MEMXは、MEMX抗体を使用して検出される。

30

40

【0034】

さらなる局面において、本発明は、被験体において、MEMX関連障害の存在、またはMEMX関連障害に対する素因を決定する方法を提供する。その方法は、被験体からの核酸サンプル（例えば、RNAもしくはDNA、またはその両方）を提供する工程、およびその被験体の核酸サンプル中のMEMX核酸の量を測定する工程を包含する。その被験体核酸中のMEMX核酸サンプルの量は、次いで、コントロールサンプル中のMEMX核酸の量と比較される。コントロールサンプル中のMEMXの量と比較してのサンプル中のMEMX核酸の量の変化は、その被験体が組織増殖関連状態を有することを示す。

【0035】

50

なおさらなる局面において、本発明は、MEMX関連障害を処置または予防または遅延するための方法を提供する。その方法は、そのような処置または予防または遅延が所望される被験体に、MEMX核酸、MEMXポリペプチド、またはMEMX抗体を、被験体における組織増殖関連状態を処置、予防、遅延するために十分な量で投与する工程を包含する。

【0036】

特に規定されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似かまたは等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に記載される。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参考として本明細書において援用される。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであって、限定することを意図しない。

【0037】

本発明のそ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。

【0038】

(発明の詳細な説明)

本発明は、新規ヌクレオチドおよびそれ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、新規核酸配列およびこれらのポリペプチドが含まれる。これらの配列を、包括的に「MEMX核酸」または「MEMXポリヌクレオチド」と称し、そして対応するコードされるポリペプチドを、「MEMXポリペプチド」または「MEMXタンパク質」と称する。他に示さない限り、「MEMX」とは、本明細書中に開示される新規な配列のいずれかをいうことを意味する。表1は、MEMX核酸およびこれらにコードされるポリペプチドの要約を提供する。

【0039】

【表1】

表 1

MEMX 割当	内部 識別	配列番号 (核酸)	配列番号 (ポリペプチド)	相同性
1	AL021392, AL031588, および AL031597 の構築物	1	2	7回膜貫通型 受容体タンパク質
2	21659259 EXT 1	3	4	グルタミン酸受容体
3	21659259 EXT 2	5	6	グルタミン酸受容体
4	21659259 EXT 3	7	8	グルタミン酸受容体
5	16418841	9	10	カリウムチャンネル タンパク質
6	AC016485_A	11	12	ホスホターゼIタンパク質
7	AC018653_A	13	14	レチノール結合タンパク質
8	AC18653A dal	15	16	レチノール結合タンパク質

MEMX核酸およびこれらにコードされるポリペプチドは、種々の用途および関連において有用である。本発明による種々のMEMXの核酸およびポリペプチドは、ドメインの存在、および以前に記載されたタンパク質に対する配列関連性に従うタンパク質ファミリーのメンバーとして有用である。さらに、MEMX核酸およびポリペプチドはまた、MEM

Xポリペプチドが属するファミリーのメンバーであるタンパク質を同定するために使用され得る。

【0040】

例えば、MEM1は、7回膜貫通受容体タンパク質ファミリーのタンパク質のメンバーに相同である。従って、MEM1核酸およびポリペプチド、抗体および本発明に従う関連する化合物は、免疫治療、ウイルス感染、神経学的障害（例えば、アルツハイマー病またはパーキンソン病）、癌（例えば、乳房または神経芽細胞腫）、腎臓病学、および雌性生殖の健康における治療的および診断的適用において有用である。

【0041】

MEM2、MEM3およびMEM4は、Glutamate Receptorファミリーのタンパク質のメンバーに相同的である。従って、本発明に従う、MEM2～MEM4の核酸およびポリペプチド、抗体および関連分子は、肺および／または脳に標的化される治療および診断適用において、有用である。脳において、それは、精神分裂病を処置するか、または頭部損傷に続く神経損傷を減少するための標的レセプターとして機能し得る。

【0042】

MEM5は、Potassium Channel Proteinファミリーのタンパク質のメンバーに相同的である。従って、本発明に従う、MEM5核酸およびポリペプチド、抗体ならびに関連化合物は、心臓およびタンパク質の筋肉障害の処置（例えば、抗不整脈薬剤）、凝固不全における、不完全に凝固する第XI因子の補充、およびコバラミン不全（例えば、悪性貧血）における治療的および診断的適用において有用である。

【0043】

MEM6は、Phosphatase I Proteinファミリーのタンパク質のメンバーに相同的である。従って、本発明に従うMEM6核酸およびポリペプチド、抗体ならびに関連分子は、糖尿病およびグリコゲン代謝の調節不全に由来する関連障害の処置における治療および診断適用において有用である。

【0044】

MEM7およびMEM8は、Retinol-Binding Proteinファミリーのタンパク質のメンバーに対して相同的である。従って、本発明に従う、MEM7およびMEM8核酸およびポリペプチド、抗体ならびに関連分子は、視覚関連障害（例えば、角膜軟化症）、ならびに癌および／または類似の腫瘍性病状の処置における治療および診断適用において有用である。

【0045】

MEMX核酸およびポリペプチドはまた、MEMX活性または機能を阻害または増強する分子についてスクリーニングするために使用され得る。本発明に従うMEMX核酸およびポリペプチドについてのさらなる利用が、本明細書中に開示される。

【0046】

(MEM1)

本発明に従うMEM1配列は、7回膜貫通レセプターファミリーのタンパク質に関連するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。7回膜貫通レセプタータンパク質に類似する新規なタンパク質をコードする新規な核酸（CuraGen ACC番号AL021392、AL031588およびAL031597と称される）のヌクレオチド配列〔配列番号1〕が図1に示される。オープンリーディングフレーム（ORF）が、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された。開始コドンから上流にあり、そして終止コドンから下流にある推定未翻訳領域が、下線によって示され、そして開始コドンおよび終止コドンが太文字で示される。コードされたタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号2〕が、図2に一文字表記で表される。

【0047】

核酸配列データベースのBLASTN検索において（図3を参照のこと）、例えば、MEM1核酸配列は、以下を含む配列（HS1163J1と称される）とに対して陽性である、218塩基のうちの203塩基（93%）および、それに同一な、218塩基のうちの

203塩基(93%)を有する：マウスCelsr1およびラットMEGF2に類似なタンパク質を含む新規なKIAA0279様EGF様ドメインについての遺伝子の3'領域；C. elegans B0035.16および細菌tRNA(5'-メチルアミノメチル-2-チオウリジレート)-メチルトランスフェラーゼに類似するタンパク質についての新規な遺伝子；ならびにマウスB99に類似するタンパク質についての新規な遺伝子の3'領域。

【0048】

アミノ酸データベースの検索において、本発明のMEM1タンパク質は、7回膜貫通レセプタータンパク質前駆体MouseA(p t n r : P I R - I D : T 1 4 1 1 9、図4を参照のこと)と陽性である、186アミノ酸残基のうちの172残基(91%)およびそれに同一な、186残基のうちの162残基(87%)を有し、この7回膜貫通レセプタータンパク質前駆体MouseAは、マウスにおける胚形成の間に発現される7回膜貫通レセプタータンパク質のCelsrファミリーのメンバーである。BlastP検索において(図5を参照のこと)、本発明のタンパク質は、7回膜貫通レセプタータンパク質前駆体MouseAのアミノ酸残基と陽性である、2632アミノ酸残基のうちの2345残基(89%)およびそれに同一な、2632残基のうちの2139残基(81%)を有することが見出された。

10

【0049】

多重配列整列が図6に示され、関連配列と本発明のタンパク質を比較するClustal W分析において、本発明のタンパク質がライン2に示される。

20

【0050】

7回膜貫通レセプターファミリーのタンパク質に類似するタンパク質をコードする本発明の新規な核酸は、その配列[配列番号1]が図1に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図1に示される対応する塩基から変化され得るが、そのレチノール結合活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

30

【0051】

本発明の新規なタンパク質は、その配列[配列番号2]が図2に提供される7回膜貫通レセプタータンパク質に類似するタンパク質を含む。本発明はまた、その残基のいずれかが、図2に示される対応する残基から変化され得るが、そのレチノール結合活性および生理学的機能に類似するタンパク質を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント(例えば、F_{a b}または(F_{a b})₂など)を包含する。

40

【0052】

(MEM2、MEM3、およびMEM4)

本発明に従うMEM2、MEM3、およびMEM4配列は、ヒトグルタメートレセプターファミリーのタンパク質に関連するポリペプチドをコードする核酸を含む。ヒトグルタメートレセプターMEM2(Internal同定番号21659259 EXT 1)；MEM3(Internal同定番号21659259 EXT 2)；およびMEM4(Internal同定番号21659259 EXT 3)の3つの改変体が、本発明

50

において開示される。これらの異なる配列は、明らかに、核酸レベルでのスプライス改変体（または類似の欠失）から生じ、そして以前に報告されたグルタメートレセプター（SPTREMBL-ACC:O60391）の肺特異的なスプライス形態と類似する。3つのスプライス改変体の各々を以下に議論する。

【0053】

（スプライス改変体21659259 EXT 1（MEM2））

本発明のMEM2（Internal Identification番号21659259 EXT 1）の1つのスプライス改変体のヌクレオチド配列が、図7〔配列番号3〕に示される。オープンリーディングフレーム（ORF）が、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された。開始コドンおよび終止コドンが、太文字で示される。コードされたタンパク質が、図8〔配列番号4〕に一文字アミノ酸表記を使用して示される。

【0054】

このスプライス改変体において、差異がアミノ酸残基360に見出され、ここで、73個のアミノ酸残基が、欠失されることが示された（すなわち「スプライスアウト」）。これらのアミノ酸残基はまた、最も良好なBlast-Xタンパク質適合（SPTREMBL-ACC:O60391）に存在する。これらの73アミノ酸残基がまた、ヒト脳由来の報告されたグルタメートレセプター（SWISSPROT-ACC:Q14957）においてスプライスアウトされることに注意することは重要である。従って、この改変体は、肺および脳の両方に存在するグルタメートレセプターのアイソフォームを表し得る。

【0055】

本発明の21659259 EXT 1のアセンブリを導くBLAST比較が図9に示される。上記のように、本発明の配列は、ゲノム配列（SPTREMBL-ACC:O60391）と適合する。これらの配列の構築および確認において、1つの修正が、SeqCalignTMアセンブリについてなされ、これは、個のアセンブリのヌクレオチド104にGを加えた。配列決定微量出現（sequencing trace appearance）はまた、別のGが、塩基対104でこの配列に存在しうることを示唆することに注意した。さらに、Gを加えることは、タンパク質におけるフレームシフトを補正し、そして他の報告されたレセプターとのより良好なBlast-X適合を生じた。この遺伝子21659259 EXT 1は、以前に報告された遺伝子（SPTREMBL-ACC:O60391）とは異なる。公的なデータベースにおけるタンパク質（SPTREMBL-ACC:O60391）は、本発明の21659259 EXT 1配列において失われた73アミノ酸を含む。本発明で開示されたアセンブリ（21659259 EXT 1）（これは、胎児肺組織由来である）は、報告されたタンパク質のスプライス改変体を表す。これは、ゲノム配列（GENBANK-ID:AC004528）の塩基22806～23025の省略を表す。

【0056】

公的なデータベースにおけるタンパク質（SPTREMBL-ACC:O60391）はさらに、ゲノム配列（GENBANK-ID:AC004528）のエキソン（すなわち、塩基対25855～26000）の開始において、6個のアミノ酸残基を含む。本発明で開示された配列において、しかし、同じエキソンは、塩基対25873～26000bpの間の領域のみを含み、そしてゲノム配列の塩基対25855～25873の間に存在する18のヌクレオチドを含まない。従って、本発明のタンパク質改変体21659259 EXT 1は、ヒトおよびラットの参照配列に存在し、これらの失われた塩基によってコードされる、6個のアミノ酸を欠く。

【0057】

さらに、公的なデータベースに見出されるタンパク質（SPTREMBL-ACC:O60391）はまた、本発明において、GenScanによって予測される430bpを含む最後のエキソンを欠く。このエキソンは、終止コドンTGAで終わる。改変体21659259 EXT 1を同定する際に使用されるBLASTX比較が図10に示される。

【0058】

改変体 21659259 EXT 1 の多重配列整列が図 11 に示され、関連配列と本発明のタンパク質を比較する ClustalW 分析において、本発明のタンパク質がライン 3 に示される。73 残基および 6 残基の欠失が示され、これは C 末端伸長である。

【0059】

(スプライス改変体 21596259 EXT 2 (NEM3))

本発明の第二のスプライス改変体である MEM3 (Internal Identification 番号 21659259 EXT 2) のヌクレオチド配列 [配列番号 5] が図 12 に示される。オープンリーディングフレーム (ORF) は、atg 開始コドンで始まり、そして tga 終止コドンで終わることが同定された。開始コドンおよび終止コドンが、太文字で示される。コードされたタンパク質 [配列番号 6] が、図 13 に一文字アミノ酸表記を使用して示される。

10

【0060】

MEM2 (21659259 EXT 1 改変体) に見出される 3 つの特徴の 2 つはまた、このスプライス改変体とともに存在することが示された。しかし、MEM2 (21659259 EXT 1) について注意された 18 ヌクレチドの省略は、このフラグメントが種々のグルタメートレセプターに存在するという事実の観点から含まれるべきであることが考えられた。従って、これらのヌクレオチドによってコードされたアミノ酸は、この改変体のアミノ酸配列に含まれる。

【0061】

本発明の 21659259 EXT 2 改変体のアセンブリに導く BLASTN 比較が、図 14 に含まれる。改変体 21659259 EXT 2 を同定する際に使用される BLASTX 比較が、図 15 に示される。

20

【0062】

図 16 に与えられる多重配列整列は、MEM3 改変体 21659259 EXT 2 の多重配列整列であり、関連配列と本発明のタンパク質を比較する ClustalW 分析において、本発明のタンパク質がライン 3 に示される。73 残基の欠失が示され、これはカルボキシル末端伸長である。

【0063】

(スプライス改変体 21596259 EXT 3 (MEM4))

本発明の第三のスプライス改変体である MEM4 (Internal Identification 番号 21659259 EXT 3) のヌクレオチド配列 [配列番号 7] が図 17 のヌクレチド配列に示される。オープンリーディングフレームは、atg 開始コドンで始まり、そして tga 終止コドンで終わることが同定された。開始コドンおよび終止コドンは、太文字である。コードされたタンパク質のアミノ酸配列 [配列番号 8] が、図 18 に一文字表記を使用して示される。

30

【0064】

MEM2 (21659259 EXT 1) に見出される 3 つの特徴のうちの 1 つはまた、この改変体に生じる。このフラグメントが種々のグルタメートレセプターに存在することが示されているという事実のために、MEM2 (21659259 EXT 1) について注意された 18 ヌクレオチドの省略、ならびに 73 アミノ酸の欠失の両方は、このスプライス改変体の配列に含まれた。従って、この欠失によって表されるアミノ酸配列は、この改変体のアミノ酸配列に含まれる。

40

【0065】

MEM4 のアセンブリに導く BLASTN 比較が、図 19 に示される；MEM4 を同定する際に使用される BLASTX 比較が、図 20 に示される。SPTREMBL-ACC: O60391 配列の 901 残基のうちの 900 についての適合が、21659259 EXT 3 の配列と 100% 同一であるが、公的なタンパク質 (SPTREMBL-ACC: O60391) は、本発明のスプライス改変体に含まれる末端の 143 アミノ酸を欠くことが見出されている。

50

【0066】

改変体 21659259 EXT 3と関連タンパク質配列を比較するClustalW分析が図21に示され、本発明のタンパク質がライン3に示される。さらに、カルボキシル末端伸長が示される。

【0067】

本発明のMEM2、MEM3およびMEM4（すなわち、21659259 EXT 1；21659259 EXT 2；および21659259 EXT 3）の3つのスプライス改変体の比較整列が、図22に示される。

【0068】

グルタメートレセプターをコードする本発明の新規な核酸は、その配列が、図7〔配列番号3〕；図12〔配列番号5〕；および図17〔配列番号7〕に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図7、12および17に示される対応する塩基から変化され得るが、そのグルタメート様レセプター活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

【0069】

本発明の新規なタンパク質は、以下のタンパク質を含む：図8〔配列番号4〕；図13〔配列番号6〕；および図18〔配列番号8〕。本発明はまた、その残基のいずれかが、図8、図13および図18に示される対応する残基から変化され得るが、そのグルタメート様レセプター活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、F_{ab}または(F_{ab})₂など）を包含する。

【0070】

(MEM5)

本発明に従うMEM5配列は、カリウムチャネルタンパク質に関連するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。イオンチャネル様タンパク質をコードする1110ヌクレオチド(Internal Identification番号1641884__EXT)の新規なヌクレオチド配列〔配列番号9〕が図23に示される。828ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(ORF)は、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された(図23〔配列番号9〕を参照のこと)。推定未翻訳領域(一方は、開始コドンから上流、そして他方は終止コドンの下流)が、図23の下線によって示されるが、開始コドンおよび終止コドンは、太文字である。275アミノ酸残基を含むコードされたタンパク質の配列〔配列番号10〕が、図24に一文字アミノ酸表記を使用して示される。

【0071】

配列データベース(図25を参照のこと)の検索において、例えば、本発明のタンパク質の核酸配列が、ヒトカリウムチャネルタンパク質K⁺Hnov42(patp:Y34130；国際公開番号WO9943696 A1を参照のこと)に同一である、286アミノ酸残基のうちの286残基(100%)およびそれと陽性である286アミノ酸残基のうちの286残基(100%)を有することが見出されたことが見出された。

【0072】

疎水性プロットは、本発明のタンパク質が、短いN末端の親水性配列（1～44aa）、続いて疎水性領域（41～65aa、ピークの疎水性＝1）、続いて親水性C末端を有することを示す。SignalP分析は、シグナルペプチドが存在しないことを示唆するが、41～65の疎水性部分が、それにも関わらず、切断可能なシグナルペプチドであり得る。

【0073】

本発明の新規な核酸は、その配列〔配列番号9〕が、図23に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図23に示される対応する塩基から変化され得るが、その活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

【0074】

本発明の新規なタンパク質は、その配列〔配列番号10〕が図24に提供されるタンパク質を含む。本発明はまた、その残基のいずれかが、図24に示される対応する残基から変化され得るが、そのカリウムチャンネル活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、F_{ab}または（F_{ab}）₂など）を包含する。

【0075】

(MEM6)

本発明に従うMEM6配列は、グリコゲンに結合する、ホスファターゼ1タンパク質ファミリーに関連するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。グリコゲン結合タンパク質ホスファターゼ1様タンパク質をコードする新規な核酸（Internal Identification番号AC016485_A）のヌクレオチド配列〔配列番号11〕が図26に示される。オープンリーディングフレーム（ORF）は、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された。開始コドンから上流にあり、そして終止コドンから下流にある推定未翻訳領域が、下線によって示され、そして開始コドンおよび終止コドンが、太文字で示される。コードされたタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号12〕が、図27に一文字表記を使用して示される。

【0076】

配列データベースの検索において、例えば、核酸配列〔配列番号11〕は、タンパク質ホスファターゼ1（GL-サブユニット）（GENBANK-ID: Y18208；図28を参照のこと）に対するラットmRNAと同一である、903アミノ酸残基のうちの763残基（84%）を有することが見出された。本発明のタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号12〕は、ラット由来の284残基の肝臓グリコゲン結合サブユニットタンパク質ホスファターゼ1（ACC: Q63759；図29を参照のこと）と同一である、284アミノ酸残基のうちの255残基（89%）およびそれと陽性である284残基のうちの270残基を有することが見出された。

【0077】

多重配列整列が図30に示され、本発明のタンパク質を関連タンパク質配列と比較するClustalW分析において、本発明のタンパク質がライン2に示される。

【0078】

グリコゲン結合タンパク質ホスファターゼ1をコードする本発明の新規な核酸は、その配列〔配列番号11〕が、図26に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図26に示される対応する塩基から変化され得るが、そのグリコゲン結合タンパク質ホスファターゼ1様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

【0079】

本発明の新規なタンパク質は、その配列〔配列番号12〕が図27に提供されるグリコゲン結合タンパク質ホスファターゼ1様タンパク質を含む。本発明はまた、その残基のいずれかが、図27に示される対応する残基から変化され得るが、そのグリコゲン結合タンパク質ホスファターゼ1様活性および生理学的機能を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、F_{ab}または(F_{ab})₂など）を包含する。

【0080】

(MEM7)

本発明に従うMEM7配列は、レチノール結合タンパク質ファミリーに関連するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。レチノール結合タンパク質に類似する新規なタンパク質をコードする核酸(Internal Identification番号AC018653__A)のヌクレオチド配列〔配列番号13〕が図31に示される。オープンリーディングフレーム(ORF)は、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された。開始コドンから上流にあり、そして終止コドンから下流にある推定未翻訳領域が、下線によって示され、そして開始コドンおよび終止コドンが、太文字で示される。コードされたタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号14〕が、図32に一文字表記を使用して示される。

【0081】

配列データベースの検索において、例えば、本発明のタンパク質のMEM7アミノ酸配列〔配列番号14〕は、ヒトサイトスタチンIタンパク質(patp:W27561;図33を参照のこと)に同一である、70アミノ酸残基のうちの68残基(97%)、およびそれと陽性である70残基のうちの70残基(100%)を有することが見出された。

【0082】

レチノール結合タンパク質に類似するタンパク質をコードする本発明の新規な核酸は、その配列〔配列番号13〕が、図31に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図31に示される対応する塩基から変化され得るが、そのレチノール結合活性および生理学的機能に類似するそのタンパク質を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホス

フェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

【0083】

本発明の新規なタンパク質は、その配列〔配列番号14〕が図32に提供されるレチノール結合タンパク質に類似するタンパク質を含む。本発明はまた、その残基のいずれかが、図32に示される対応する残基から変化され得るが、レチノール結合活性およびその生理学的機能に類似するそのタンパク質を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、 F_{ab} または $(F_{ab})_2$ など）を包含する。

10

【0084】

(MEM8)

本発明に従うMEM8配列は、レチノール結合タンパク質ファミリーに関連するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。レチノール結合タンパク質に類似する新規なタンパク質をコードする新規な核酸（Curagen Acc. 番号AC018653A_dal）のヌクレオチド配列〔配列番号15〕が図34に示される。オープンリーディングフレーム（ORF）は、atg開始コドンで始まり、そしてtga終止コドンで終わることが同定された。開始コドンから上流にあり、そして終止コドンから下流にある推定未翻訳領域が、下線によって示され、そして開始コドンおよび終止コドンが、太文字で示される。コードされたタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号16〕が、図35に一文字表記を使用して示される。

20

【0085】

両方のデータベース分析において（図36を参照のこと）、本発明のタンパク質のアミノ酸配列〔配列番号16〕は、135アミノ酸残基のヒトサイトスタチンIIIタンパク質（patp:W30891）と陽性である、135アミノ酸残基のうちの135残基（100%）、およびそれと同一である135残基のうちの133残基（98%）を有することが見出された。

30

【0086】

多重配列整列が図37に示され、本発明のタンパク質を関連タンパク質配列と比較するClustalW分析において、本発明のタンパク質がライン2に示される。

【0087】

レチノール結合タンパク質に類似するタンパク質をコードする本発明の新規な核酸は、その配列〔配列番号15〕が、図34に提供される核酸、またはそのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが、図34に示される対応する塩基から変化され得るが、そのレチノール結合活性および生理学的機能に類似するそのタンパク質を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体核酸、またはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列がたった今記述された配列に相補的である核酸を含み、これは、たった今記述された核酸のいずれかに相補的な核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学改変を含む、核酸または核酸フラグメント、あるいはその相補体を含む。このような改変は、非限定的な例として、改変塩基、およびその糖ホスフェート骨格が改変または誘導体化される核酸を含む。これらの改変は、少なくとも部分的に、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。変異体または改変体核酸、およびそれらの相補体において、20%以上までの塩基がそのように変化され得る。

40

【0088】

50

本発明の新規なタンパク質は、その配列〔配列番号16〕が図35に提供されるレチノール結合タンパク質に類似するタンパク質を含む。本発明はまた、その残基のいずれかが、図35に示される対応する残基から変化され得るが、レチノール結合活性およびその生理学的機能に類似するそのタンパク質を維持するタンパク質をなおもコードする変異体または改変体タンパク質、またはその機能的フラグメントを含む。変異体または改変体タンパク質において、20%以上までの残基がそのように変化され得る。本発明はさらに、本発明のタンパク質のいずれかに免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント（例えば、F_ab または (F_ab)₂ など）を包含する。

【0089】

(MEMX 核酸)

本発明の核酸は、MEMXポリペプチドまたはMEMXタンパク質をコードする核酸を含有する。本明細書において使用されるように、用語ポリペプチドおよびタンパク質は、交換可能である。

【0090】

いくつかの実施形態において、MEMX核酸は、成熟MEMXポリペプチドをコードする。本明細書中で使用される場合、本明細書中に記載されるポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチドあるいは前駆体形態またはプロタンパク質の産物に関係する。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非制限例として、対応する遺伝子によってコードされる完全長遺伝子産物が挙げられる。あるいは、本明細書中で記載されるオープンリーディングフレームによってコードされる、ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質として規定されている。産物「成熟」形態は、さらに非制限例として、遺伝子産物が産生される細胞中で発生し得る、1以上の天然に存在するプロセッシング工程の結果として発生する。ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態に導くこのようなプロセッ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ってコードされる、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分解性切断が挙げられる。従って、残基1~N（ここで、残基1は、N-末端メチオニンである）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、N-末端メチオニンの除去後に残った残基2~N末端を有する。あるいは、残基1~N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（ここで、残基1~残基MのN末端シグナル配列が切断される）は、残った残基M+1~残基Nを有する。本明細書中でさらに使用されるように、ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の、翻訳後改変事象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、非制限例として、グリコシル化、ミリスチル化、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成熟タンパク質は、結果として、これらのプロセスの1つのみの作用、またはそれらの任意の組み合わせから得られ得る。

【0091】

MEMX核酸としては、とりわけ、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15で提供される配列の核酸あるいはそれらのフラグメントである。さらに、本発明には、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15の変異体核酸または改変体核酸あるいはそれらのフラグメントが挙げられ、任意のこれらの塩基は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15に示される対応する塩基から変化され得、MEMX様の活性および生理学的機能（すなわち、新脈管形成の調節、ニューロン発生）の少なくとも1つを維持するタンパク質をさらにコードする。本発明には、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15の核酸配列の相補体（それらのフラグメント、誘導体、アナログおよびそれらのホモログを含む）がさらに挙げられる。本発明は、その構造が化学的改変を含む、核酸または核酸フラグメントあるいはそれらの相補体をさらに含む。

【0092】

本発明の1つの局面は、MEMXタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、MEMXをコードする核酸（例えば、MEM

10

20

30

40

50

X mRNA)を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用するための十分な核酸フラグメントおよびMEMX核酸分子の増幅または変異のためのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーとして使用するためのフラグメントも含まれる。本明細書において使用されるように、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産生される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が意図される。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。

【0093】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、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、そしてオリゴマー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、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

【0094】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNAまたはRNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。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、種々の実施形態で、単離されたMEMX核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸に天然で隣接する、約50kb、25kb、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。

【0095】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の相補体は、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、3、5、7、9、11、13、または15の核酸の全部または一部を使用して、MEMX核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニング技術(例えば、Sambrookら(編)、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY 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)を用いて単離され得る。

【0096】

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、MEMX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。

【0097】

本明細書で用いられる用語「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反応で用いられ得る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。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、3、5、7、9、11、13、または15の少なくとも6個連続するヌクレオチド、あるい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。

10

【0098】

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、3、5、7、9、11、13、または15に示されるヌクレオチド配列、あるいはこのヌクレオチド配列の一部分の相補体である核酸分子を含む。配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15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、3、5、7、9、11、13、または15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、3、5、7、9、11、13、または15に示される核酸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。

20

【0099】

本明細書で用いる用語「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。

【0100】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15の核酸配列の一部のみ（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MEMXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。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つかの部分である。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。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は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。

30

40

【0101】

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

50

ムによって実施される)、少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%もの同一性(好ましい同一性は、80~99%)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。例示のプログラムは、Gapプログラム(Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for UNIX(登録商標)、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI)(デフォルト設定を使用、これは、SmithおよびWatermanのアルゴリズム(Adv. Appl. Math.、1981、2:482-489、これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される)を使用する)である。

【0102】

「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、MEMX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(哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、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MEMX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MEMXタンパク質をコードする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、4、6、8、10、12、14または16の保存的アミノ酸置換(以下を参照のこと)、およびMEMX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。MEMXタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。相同的アミノ酸配列は、ヒトMEMXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0103】

ヒトMEMX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MEMXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のMEMX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、3、5、7、9、11、13、または15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個以上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、3、5、7、9、11、13、もしくは15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、3、5、7、9、11、13、または15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個以上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。

【0104】

ヒトMEMXヌクレオチド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、M

MEMX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MEMXをコードする核酸のレベルを測定すること（例えば、MEMX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムMEMX遺伝子に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。

【0105】

「MEMX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。「MEMX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、MEMXの生物学的活性（MEMX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、3、5、7、9、11、13、または15の一部を単離し、MEMX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MEMX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。例えば、MEMX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、必要に応じて、ATP結合ドメインを含み得る。別の実施形態において、MEMX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、1つ以上の領域を含む。

【0106】

（MEMX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、3、5、7、9、11、13、または15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する。それにより、これらの核酸は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15に示されるヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質（例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16のポリペプチド）と同じMEMXタンパク質をコードする。

【0107】

配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15に示されるヒトMEMXヌクレオチド配列に加えて、MEMX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。MEMX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、MEMXタンパク質、好ましくは哺乳動物のMEMX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、MEMX遺伝子のヌクレオチド配列において1～20%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MEMXの機能的活性を変化させない、MEMX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。

【0108】

さらに、他の種由来のMEMXタンパク質をコードし、従って、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15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MEMX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MEMX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。例えば、可溶性ヒトMEMX cDNAは、ヒトの膜結合MEMXに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトMEMX cDNAは、可溶性ヒトMEMXに対するその相同性に基づいて単離され得る。

【0109】

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、3、5、7、9、11、13、

または15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または750ヌクレオチド長である。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。

【0110】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のMEMX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。

10

【0111】

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（ T_m ）より約5℃低いように選択される。この T_m 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、 T_m 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。

20

30

【0112】

ストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そして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620%、約70%、約72%、約82%、約90%、約92%、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る。このハイブリダイゼーションに、0.2×SSC、0.01% BSA中での50℃での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15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。

40

【0113】

第2の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15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

50

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。

【0114】

第3の実施形態では、配列番号1、3、5、7、9、11、13、もしくは15、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、320%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM 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、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM 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(cross-species)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。

【0115】

(I. 保存的変異)

集団中に存在し得る、MEMX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、3、5、7、9、11、13、または15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、MEMX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MEMX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しヌクレオチド置換は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15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、MEMX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、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のMEMX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。

【0116】

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、MEMXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなMEMXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2、4、6、8、10、12、14または16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、4、6、8、10、12、14または16のアミノ酸配列に少なくとも約720%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、4、6、8、10、12、14または16に少なくとも約80%相同性であり、より好ましくは配列番号2、4、6、8、10、12、14または16に、少なくとも約90%、約92%、約98%相同性であり、そして最も好ましくは少なくとも約99

10

20

30

40

50

% 相同性である。

【0117】

タンパク質に相同なMEMX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、3、5、7、9、11、13、または15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。

【0118】

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1、3、5、7、9、11、13、または15のヌクレオチド配列に導入され得る。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。10
。「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、アスパラギン酸、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、MEMX 20
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、MEMX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、MEMX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1、3、5、7、9、11、13、もしくは15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。

【0119】

1つの実施形態では、変異MEMXタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：（i）他のMEMX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MEMXタンパク質と、MEMXのレセプターとの間の複合体形成；（iii）変異MEMX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）；（iv）MEMXタンパク質に結合する能力；あるいは（v）抗MEMXタンパク質抗体に特異的に結合する能力。30

【0120】

（アンチセンスMEMX核酸）

本発明の別の局面は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、または配列番号15のヌクレオチド配列を含む核酸にハイブリダイズ可能かまたは相補的である単離された単離されたアンチセンス核酸分子、あるいはそのフラグメント、アナログ、または誘導体に関する。40
。「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、25、50、100、250もしくは500ヌクレオチドまたはMEMXコード鎖全体、またはそれらのタンパク質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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のMEMX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、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号50

13、または配列番号15のMEMXの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。

【0121】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、MEMX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」に対する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（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のいずれかに対応するヒトMEMXのタンパク質コード領域）をいう。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、MEMX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」に対する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）。

10

【0122】

本明細書中に開示されるMEMXをコードするコード鎖配列（例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、または配列番号15）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Hogsteen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、MEMX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、オリゴヌクレオチドが、MEMX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみに対するアンチセンスであることが、より好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、MEMX mRNAの翻訳開始部位の周囲の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、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチド長であり得る。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）。

20

【0123】

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（galactosyl queosine）、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（mannosyl queosine）、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）、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、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、以下の節にさらに記載される、目的の標的核酸に対するアンチセンス方向である）。

30

40

50

【0124】

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、MEMXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび／もしくはゲノム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プ（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。これは、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る。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。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、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、一般的に好ましい。

10

【0125】

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する。ここで、通常の β -ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する（Gaultierら、1987、Nucleic 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（Inoueら、1987、Nucleic Acids Res. 15:6131~6148を参照のこと）またはキメラRNA-DNAアナログ（Inoueら、1987、FEBS Lett. 215:327~330を参照のこと）を含み得る。

20

【0126】

このような改変としては、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、少なくとも一部が、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。

30

【0127】

（MEMXリボザイムおよびPNA部分）

なお別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、ハンマーヘッド型リボザイム（HaselhoffおよびGerlach、1988、Nature 334:585~591を参照のこと））を使用して、MEMX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってMEMX mRNAの翻訳を阻害し得る。MEMX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MEMX DNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1）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、MEMX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、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、MEMX mRNAを使用して、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。

40

【0128】

50

あるいは、MEMX遺伝子発現は、MEMXの調節領域（例えば、MEMX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MEMX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。一般には、Helene.、1991、Anticancer Drug Des. 6: 569～84; Heleneら（1992）Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27～36; およびMaher（1992、Bioassays 14: 807～15を参照のこと。

【0129】

種々の実施形態において、MEMXの核酸は、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（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つの天然の核酸塩基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、前出のHyrupら（1996）; Perry-O'Keefeら、1996、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 14670～675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。

10

20

【0130】

MEMX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。MEMX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か; 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か（Hyrup B.、1996、前出）; またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプロブもしくはプライマーとして（Hyrupら（1996）上記; Perry-O'Keefe、1996、前出）、使用され得る。

30

【0131】

別の実施形態において、MEMXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞の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か、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の有利な特性を組み合わせ得る、MEMX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。PNA-DNAキメラの合成は、行われ得る（例えば、Finnら、1996、Nucl. Acid Res. 24: 3357～63を参照のこと）。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: 5973～88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）。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. Che

40

50

m. Lett. 5: 1119~11124を参照のこと)。

【0132】

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；Lemaître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）を用いて改変され得る。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。

【0133】

(MEMXポリペプチド)

本発明のMEMXポリペプチドは、その配列が配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16において提供される配列のMEMX様タンパク質を含む。本発明はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16において示される対応する残基からいずれかの残基が変化され得る変異タンパク質または改変タンパク質を含むが、なおそのMEMX様活性および生理学的機能、またはその機能的フラグメントを維持するタンパク質をコードする。いくつかの実施形態において、変異タンパク質または改変体タンパク質において、20%までまたはそれ以上の残基がそのように変化され得る。本発明は、上記の改変体MEMX核酸によってコードされるペプチドを含む。いくつかの実施形態において、本発明に従うMEMXポリペプチドは、成熟ポリペプチドである。

【0134】

一般に、MEMX様機能を保持するMEMX様改変体は、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る任意の改変体を含み、そしてさらに、親タンパク質の2つの残基間に挿入され得る付加残基もしくは残基、および親配列由来の欠失され得る1つ以上の残基を含む。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。順境において、この置換は上記に定義されるように、保存的置換である。

【0135】

本発明の1つの局面は、単離されたMEMX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MEMX抗体を惹起するための免疫原としての使用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MEMX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、MEMX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、MEMX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。

【0136】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、MEMX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、MEMXタンパク質の調製物を含み、この調製物において、この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、この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MEMX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MEMXタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非MEMXタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非MEMXタンパク質を約20%未満有する、MEMXタンパク質の調製物を含む。MEMX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20%未満を示す。

【0137】

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關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MEMX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MEMX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MEMXポリペプチドを約20%未満、なおより好ましくは化学前駆体または非MEMXポリペプチドを約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非MEMXポリペプチドを約20%未満有する、MEMXタンパク質の調製物を含む。

【0138】

MEMXタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長MEMXタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてMEMXタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、MEMXタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16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MEMX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、MEMX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。MEMX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であるポリペプチドであり得る。

【0139】

本発明のMEMXの生物学的に活性な部分は、MEMXタンパク質ファミリー間に保存される上記の同定されたドメインの少なくとも1つを含み得る（例えば、TSRモジュール）。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MEMX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。

【0140】

実施形態において、MEMXタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質である。他の実施形態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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16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、MEMXタンパク質は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも約45%、そしてより好ましくは、約55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%でさえ相同なアミノ酸配列を含み、そして、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16のMEMXタンパク質の配列を有する対応するポリペプチドのMEMXの機能的活性を保持するタンパク質である。

【0141】

（I. 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、配列間の最適な整列について比較される配列のいずれかに導入され得る）。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）。

【0142】

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2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、または配列番号16に示されるDNA配列のCDS（コードする）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。

【0143】

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、ウィンドウサイズ）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。用語「陽性（positive）残基の百分率」は、以下により算出される：そ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、同一のアミノ酸および保守的アミノ酸置換が、上記のように両方の配列において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、比較領域中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算すること、およびその結果を100で乗算して、陽性残基の百分率を導くこと。

【0144】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、MEMX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、MEMX「キメラタンパク質」またはMEMX「融合タンパク質」は、非MEMXポリペプチドに作動可能に連結された、MEMXポリペプチドを含む。「MEMXポリペプチド」は、MEMXポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、これに対して、「非MEMXポリペプチド」は、MEMX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、MEMX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。従って、MEMX融合タンパク質において、このMEMXポリペプチドは、MEMX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、MEMX融合タンパク質は、MEMX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、MEMX融合タンパク質は、MEMX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。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、MEMXポリペプチドおよび非MEMX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MEMXポリペプチドは、MEMXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0145】

例えば、1つの実施形態では、MEMX融合タンパク質は、第2のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結されたMEMXポリペプチドを含む。このような融合タンパク質は、MEMX活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイでさらに利用され得る（このようなアッセイは、以下に詳細に記載される）。

【0146】

別の実施形態においては、この融合タンパク質は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）-MEMX融合タンパク質であり、ここではMEMX配列が、GST配列のカルボキシル末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えMEMXの精製を容易にし得る。 10

【0147】

別の実施形態においては、この融合タンパク質は、MEMX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは1つ以上のドメインを含むMEMX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MEMX-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MEMXリガントとMEMX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MEMX媒介シグナル伝達を抑制し得る。1つの非限定例においては、意図される本発明のMEMXリガントは、MEMXレセプターである。このMEMX- 20
免疫グロブリン融合タンパク質を用い、MEMX同族リガンドのバイオアベイラビリティに影響を与え得る。MEMXリガント/MEMX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害（例えば、癌）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）するために、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのMEMX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗MEMX抗体を産生するための免疫原として用いられ得、MEMXリガントを精製し、そしてMEMXリガントとのMEMX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。

【0148】

本発明のMEMX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、従来の技術に従って、例えば、連結のための平滑末端または突出（stagger）末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて突出（cohesive）末端の充填、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使用することにより、インフレイ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術により合成し得る。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引き続き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ー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、Ausubelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1 9 9 2を参照のこと）。さらに、融合部分（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。MEMXをコードする核酸は、この融合部分 40
がMEMXタンパク質にインフレイ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。

【0149】

（MEMXアゴニストおよびアンタゴニスト）

本発明はまた、MEMXアゴニスト（模倣物）として、またはMEMXアンタゴニストとして機能するMEMXタンパク質の改変体に関する。MEMXタンパク質の改変体、例えば、変異誘発（例えば、MEMXタンパク質の離散した点変異または短縮）により生成され得る。MEMXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のMEMX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。ME 50

M Xタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のM E M Xタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、M E M X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、天然に存在する形態のこのタンパク質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、天然に存在する形態のM E M Xタンパク質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。

【0150】

M E M Xアゴニスト（模倣物）として、またはM E M Xアンタゴニストのいずれかとして機能するM E M Xタンパク質の改変体は、M E M X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M E M X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、M E M X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。M E M X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M E M X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M E M X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M E M X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M E M X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公知である（例えば、N a r a n g（1983）T e t r a h e d r o n 39:3; I t a k u r aら（1984）A n n u a l R e v B i o c h e m 53:323; I t a k u r aら（1984）S c i e n c e 198:1056; I k eら（1983）N u c l A c i d R e s 11:477を参照のこと）。

【0151】

（I. ポリペプチドライブラリー）

さらに、M E M X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、M E M X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M E M X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、M E M Xコード配列の二本鎖P C R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、M E M X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。

【0152】

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、および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法が当該分野で公知である。このような技法を、M E M X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 (recrusive ensemble mutagenesis) (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、MEMX 改変体を同定し得る (例えば、Arklin 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)。

【0153】

(抗MEMX抗体)

MEMXタンパク質に対する抗体、またはMEMXタンパク質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「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン (Ig) 分子の免疫学的に活性な部分 (すなわち、抗原に特異的に結合する (免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子) をいう。このような抗体としては、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、F_{ab} フラグメント、F_{ab}・フラグメントおよび F_{(ab)2} フラグメント、ならびに F_{ab} 発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgE および IgD の任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によってお互いに異なる。特定のクラスは同様にサブクラス (例えば、IgG₁、IgG₂ など) を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖はκ鎖またはλ鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

【0154】

本発明の単離されたMEMX関連タンパク質は、抗原、またはその一部もしくはそれらのフラグメントとして役立つことが意図され得、そしてさらに、免疫原として使用され、ポリクロナール抗体およびモノクロナール抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列 (例えば、配列番号2、4、6、8、10、12、14 または 16 において示されるアミノ酸配列) の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメントと特定の免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、そのペプチド表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

【0155】

本発明の特定の実施形態では、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープは、MEMXタンパク質の表面上に位置するMEMX関連タンパク質の領域、例えば、親水性領域である。ヒトMEMX関連タンパク質配列の疎水性分析は、MEMX関連タンパク質のどの領域が特に親水性であるか、そしてそれ故、抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードするようであることを示す。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、フリーエ変換とともにまたはなしの、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、Hopp および Woods、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte および Doolittle 1982、J. Mol. Biol. 157: 105-142 を参照のこと。抗原性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内の1つ以上のドメインに対して特異的な抗体はまた、本明細書中で提供される。

【0156】

本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、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され得る。

【0157】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導体、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対して指向されるポリクロナール抗体またはモノクロナール抗体の産生のために使用され得る（例えば、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow E, および Lane D, 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと）。これらの抗体のうちのいくつかは、以下で考察される。 10

【0158】

（I. ポリクロナール抗体）

ポリクロナー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、マウスまたは他の動物）は、ネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このタンパク質は、免役されている哺乳動物において免疫原性であることが公知である第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、Freund's（完全および不完全）、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（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、Bacille Calmette-GuérinおよびCorynebacterium parvum）または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。 20 30

【0159】

免疫原性タンパク質に対して指向されるポリクロナール抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そして周知の技術（例えば、プロテインAまたはプロテインGを用いるアフィニティクロマトグラフィー（これは、主に免疫血清のIgG画分を提供する））によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはその抗原のエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientist, Inc., Philadelphia PAより発行)、第14巻、第8号（2000年4月17日）、25～28頁）によって考察される。 40

【0160】

（II. モノクローナル抗体）

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」（MAb）または「モノクローナル抗体組成物」は、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる唯一の分子種の抗体分子を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域（CDR）は、すべての分子の集団に同一である。従って、MAbは、抗原への独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0161】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法（例えば、K o h l e r および M i l s t e i n, (1975. Nature 256: 495) に記載されるような方法）を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主細胞は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0162】

免疫因子としては、代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、以下のいずれかである：ヒト起源の細胞が望まれる場合は、末梢血リンパ球が使用され、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合は、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用される。次いで、適切な融合因子（例えば、ポリエチレングリコール）を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（G o d i n g, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press (1986) 第59-103頁）。不死化細胞株は、哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞に通常形質転換される。通常ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用されるハイブリドーマ細胞は、1以上の物質（融合されていない不死化細胞の増殖も生存も阻害する）を適切に含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親の細胞が酵素、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRRT）を欠く場合、ハイブリドーマからの培養培地は、代表的にヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み（「HAT培地」）、それらの物質はHGPRT欠失細胞の増殖を阻害する。

【0163】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生細胞の安定な高レベルの抗体の発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に敏感である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫細胞株であり、それらを、例えば、S a l k Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髄腫およびマウス-ヒト骨髄腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される（K o z b o r, J. Immunol., 133: 3001 (1984); B r o d e u r, MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATION, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63頁）。

【0164】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ（例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA））によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、M u n s o n および P o l l a r d, (1980. Anal. Biochem. 107: 220) のスキッチャード分析によって決定され得る。好ましくは、標的抗原に対する高い程度の特異性および高結合親和性を有する抗体が、単離される。

【0165】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクローニングし得、そして標準方法によって増殖し得る。例えば、この目的のために適切な培養培地としては、D u l b e c c o ' s Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

10

20

30

40

50

【0166】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー）によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

【0167】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法）によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され得、そして配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞（例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインをコードする配列の置換（米国特許第4,816,567号；Morrisson、1994、Nature 368, 812-13）によってか、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてまたは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域に置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域に置換され得、キメラ二価の抗体を作製する。

【0168】

(III. ヒト化抗体)

本発明のタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトの免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗体の抗原結合配列）であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよび共同研究者の方法（Jonesら、1986、Nature, 31:522-525；Riechmannら、1988、Nature, 332:323-327；Verhoevenら、Science, 1988、239:1534-1536）の後に達成され得る。（米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。）いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格（framework）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、患者の抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも1つ、および代表的には2つの可変領域を実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてのまたは実質的にすべての骨格領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む（Jonesら、1986、上記；Riechmannら、1988、上記；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596（1992））。

【0169】

(IV. ヒト抗体)

CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から本質的に生じる抗体分子に、ヒト抗体は十分に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「十分なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ（trioma）技

10

20

30

40

50

術によって調製され得る；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、K o z b o r ら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと）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、C o l e ら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと）。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか（例えば、C o t e ら、1983. Proc Natl Acad USA 80:2026-2030を参照のこと）、またはインビトロでのE p s t e i n B a r r V i r u sを用いたヒトB細胞による形質転換によって（C o l e ら、1985: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, A l a n R. Liss, Inc., 第77-96頁を参照のこと）産生され得る。 10

【0170】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術（ファージディスプレイライブラリー（H o o g e n b o o m および W i n t e r, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks ら、J. Mol. Biol., 222:581 (1991)）を含む）を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン位置をトランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス）に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジの際にヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点（遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む）でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下 20
に記載される：米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、およびMarks ら（1992, Bio/Technology 10:779-783）；L o n b e r g ら（1994, Nature 368:856-859）；M o r r i s o n （1994, Nature 368:812-13）；F i s h w i l d ら（1996, Nature Biotech. 14:845-51）；N e u b e r g e r （1996, Nature Biotech. 14:826）；ならびにL o n b e r g およびH u s z a r （1995, International Rev. Immunol. 13:65-93）。

【0171】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答して動物の内因性抗体よりもヒト抗体を十分に産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。（PCT公開WO94/02602を参照のこと。）非ヒト宿主における重免疫グロブリン鎖および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な位置は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT公開WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにX e n o m o u s ^{T M} と呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的の免疫原を有する免疫後の動物から（例えば、ポリクローナル抗体の調製）、あるいは動物由来の不活化されたB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、1本鎖Fv分子）を得るために、さらに改変され得る。 40

【0172】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主（マウスとして例証される）を作製するための方法の例は、米国特許第5,939,598号に記載される。それを、以下の工 50

程を包含する方法によって得ることが可能である：位置の再配列を防ぎ、そして再配列された免疫グロブリン重鎖位置の転写物の形成、および選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクターによって影響される欠失を防ぐために、胚幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖位置由来のJセグメント遺伝子を欠失する工程；およびトランスジェニックマウス（その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む）を、胚幹細胞から作製する工程。

【0173】

目的の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生する方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。それは以下の工程を包含する：重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、およびハイブリッド細胞を形成するために2つの細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

10

【0174】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定する方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択する関連する方法は、PCT公開WO99/53049に開示される。

【0175】

（V. F_{ab} フラグメントおよび1本鎖抗体）

本発明に従って、技術は、本発明の抗原性タンパク質に特異的な1本鎖抗体の産生に適用され得る（例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと）。さらに、方法は、 F_{ab} 発現ライブラリーの構築に適用され得（例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと）、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメント（（i）抗体分子のペプシン消化によって産生される $F_{(ab)2}$ 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って産生された F_{ab} フラグメント（iii）パペインおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生された F_{ab} フラグメント、および（iv） F_v フラグメントを含むが、これらに限定ない）は、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

20

30

【0176】

（VI. 二重特異的抗体）

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体（好ましくはヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体）であって、これは少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には細胞表面タンパク質あるいはレセプターまたはレセプターサブユニットである。

【0177】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え生成は、2つの免疫グロブリンの重鎖／軽鎖の対の同時発現に基づき、ここでこの2つの重鎖は異なる特異性を有する（MilsteinおよびCuello、1983、Nature, 305:537-539）。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ（すなわち、クアドローマ）は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を作製し、このうち1つのみが正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、PCT公開WO93/08829（1993年5月13日開示）、およびTraunckerら、1991 EMBO J.、10:3655-3659において開示される。

40

【0178】

50

所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常領域配列に融合され得る。この融合は、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有し、ヒンジ、C H 2、およびC H 3領域の少なくとも部分を含む。この融合物中の少なくとも1つに存在する軽鎖結合のために必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（C H 1）を有することが好ましい。この免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、この免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の作製のさらなる詳細は、例えば、Sureshら、1986、Methods Enzymology, 121: 210を参照のこと。

【0179】

PCT公開WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常領域のC H 3領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置換される。大きな側鎖についての同一または同様のサイズの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成される。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物よりも、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

【0180】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、F (a b')₂ 二重特異的抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら（1985、Science 229: 81）は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されてF (a b')₂ フラグメントを作製する手順を記載する。これらのフラグメントは、ビスナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウム塩の存在下で還元される。次いで、この作製されたF a b' フラグメントは、チオニトロベンゾエート（TNB）誘導体に変換される。次いで、F a b' -TNB誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によってF a b' -チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他のF a b' -TNB誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【0181】

さらに、F a b' フラグメントは、E. coli から直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、J. Exp. Med. 175: 217-225（1992）は、完全にヒト化された二重特異的抗体F (a b')₂ 分子の生成を記載する。各F a b' フラグメントは、E. coli から別々に分泌され、そしてインビトロの化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

【0182】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離するための種々の技術が記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生される。Kostelnyら、J. Immunol. 148 (5): 1547-1553（1992）。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のF a b' 部分に結合される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた、抗体ホモダイマーの産生のために使用され得る。Hollingerら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6

10

20

30

40

50

448 (1993)) に記載されるこの「ディアボディー (d i a b o d y)」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間を対にできないリンカーによって軽鎖可変領域 (V_L) に接続された重鎖可変領域 (V_H) を含む。従って、1つのフラグメントの V_H および V_L ドメインは、別のフラグメントの相補的な V_L および V_H ドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位が形成する。単鎖 F_v (s F_v) ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されてきた (G r u b e r ら、J. I m m u n o l. 152: 5368 (1994))。

【0183】

10

2より多くの結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る (T u t t ら、J. I m m u n o l. 147: 60 (1991))。

【0184】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子のような白血球 (例えば、C D 2、C D 3、C D 28、またはB7)、あるいはI g Gに対するF cレセプター (F c R) (例えば、F c R I (C D 64)、F c R I I (C D 32) およびF c R I I I (C D 16)) 上の標的化分子に結合するアームに、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞傷害性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター (例えば、E O T U B E、D P T A、D O T A、またはT E T A) に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子 (T F) に結合する。

20

【0185】

(V I I. ヘテロ接合体抗体)

ヘテロ接合体抗体はまた、本発明の範囲内である。ヘテロ接合体抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不必要な細胞に標的化するために (米国特許第4, 676, 980号)、およびH I V感染の処置のために (W O 91/00360; W O 92/200373; E P 03089) 提案されてきた。この抗体 (架橋剤を含む抗体を含む) は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4, 676, 980号において開示される試薬が挙げられる。

30

【0186】

(V I I I. エフェクター機能操作)

本発明の抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましい。例えば、システイン残基は、F c領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、作製されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) を有し得る。C a r o n ら、J. E x p. M e d.、176: 1191-1195 (1992) およびS h o p e s、J. I m m u n o l. 148: 2918-2922 (1992) を参照のこと。増大した抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、W o l f f ら (C a n c e r R e s e a r c h、53: 2560-2656 (1993)) に記載されるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のF c領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびA D C Cの可能性を有し得る (S t e v e n s o n ら、A n t i - C a n c e r D r u g D e s i g n、3: 2

40

50

19-230 (1989))。

【0187】

(IX. 免疫接合体)

本発明はまた、細胞傷害性の薬剤（例えば、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち、放射性接合体））に結合した抗体を含む免疫接合体に関する。

【0188】

このような免疫接合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（*moderatin*）A鎖、 α -サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、*momordica charantia*インヒビター、クルシン（*curcin*）、クロチン（*crotin*）、*sepaonaria officinalis*インヒビター、ゲロニン（*gelonin*）、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン（*restrictocin*）、フェノマイシン（*phenomycin*）、エノマイシン（*enomycin*）、およびトリコテセン（*tricothecen*）が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。その例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0189】

抗体および細胞傷害性因子の接合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子（例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（*iminothiolane*）（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート HCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド（*glutaraldehyde*））、ビスアジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2, 6-ジイソシアネート）、およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン））を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vittettaら（*Science*, 238:1098 (1987)）に記載されるように調製され得る。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。

【0190】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に結合され得、ここで抗体-レセプター接合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない接合体が循環から除去され、次いで細胞傷害性因子に次々に結合する「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

【0191】

(MEMX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、MEMX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、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。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、これが接続された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される（

例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。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、このプラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、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）のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

10

【0192】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される、1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする（例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、インビトロ転写／翻訳系または宿主細胞において）ような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。

【0193】

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向する配列、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向する配列（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べき宿主細胞の選択、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理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸により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融合ペプチドを含む）（例えば、MEMXタンパク質、MEMXタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

20

30

【0194】

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、MEMXタンパク質の発現のために設計され得る。例えば、MEMX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）においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、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。

40

【0195】

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向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において実行される。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こと；（ii）組換えタンパク質

50

の溶解度を増加させること；および（iii）親和性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こと。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、融合部分の結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、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、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith and 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。 10

【0196】

適切な誘導性非融合E. coli発現ベクターの例としては、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。

【0197】

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つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれ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。別の戦略は、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、Wadara（1992）Nucl. 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。 20

【0198】

別の実施形態において、MEMX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母Saccharomyces. cerevisiae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。 30

【0199】

あるいは、MEMX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。培養された昆虫細胞（例えば、SF9細胞）中で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。 40

【0200】

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 50

、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の他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第2版、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。

【0201】

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向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、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）、特に、T細胞レセプタープロモーター（WinotoおよびBaltimore（1989）*EMBO J* 8: 729-733）および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）*Cell* 33: 729-740；QueenおよびBaltimore（1983）*Cell* 33: 741-748）のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロ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）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；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。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）*Science* 249: 374-379）およびα-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））。

【0202】

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、MEMX 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。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、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る調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび／もしくはエンハンサー、または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議論については、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。

【0203】

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、特定の対象の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いうことが理解される。変異または環境的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存在し得るので、このような子孫は、実際、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ような用語の範囲内に含まれる。

【0204】

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、MEMX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、ヒトチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0205】

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）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識され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殿、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ト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 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。

10

【0206】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、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をそのゲノム中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、薬物に対する耐性を付与するマーカー（例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキセート）が含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、MEMX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。導入された核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、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）。

20

【0207】

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、MEMX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、MEMX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、この方法は、MEMX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、MEMX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、この方法はさらに、培地または宿主細胞からMEMXを単離する工程を包含する。

30

【0208】

（トランスジェニックMEMX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、MEMXタンパク質コード配列が導入される、受精した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、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、ここで外因性のMEMX配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物（ここで内因性のMEMX配列が変更されている）に導入される。このような動物は、MEMXタンパク質の機能および／または活性を研究するため、およびMEMXタンパク質の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、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動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ

40

50

、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ（この細胞からトランスジェニック動物が発生する）、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、この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遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性MEMX遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0209】

本発明のトランスジェニック動物は、MEMXをコードする核酸を、（受精した卵母細胞の雄性前核に導入することによって例えば、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）、およびこの卵母細胞が偽妊娠雌性フォスター動物（*foster animal*）中で発生す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、3、5、7、9、11、13または15のMEMX 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MEMX遺伝子の非ヒトホモログ（例えば、マウスMEMX遺伝子）は、ヒトMEMX 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（上述にさらに記載される）、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、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、MEMXタンパク質の発現を指向するために、MEMX導入遺伝子に作動可能に連結される。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）を生成するための方法は、当該分野で従来的になっており、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。同様の方法は、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初代動物は、そのゲノムにおけるMEMX導入遺伝子の存在および／またはその動物の組織または細胞中のMEMX 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初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、MEMX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へと繁殖させ得る。

【0210】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってMEMX遺伝子に変化（例えば、機能的に破壊）されている、少なくとも、MEMX遺伝子の一部を含むベクターを調製する。MEMX遺伝子は、ヒト遺伝子（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15のDNA）であり得るが、より好ましくは、ヒトMEMX遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13または15のヒトMEMX遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性MEMX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、内因性MEMX遺伝子が、機能的に破壊される（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）ように設計される。

【0211】

あるいは、このベクターは、相同組換えの際に、内因性MEMX遺伝子に変異されるか、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る（例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性MEMX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、MEMX遺伝子の変更された部分は、MEMX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、相同

組換えが、ベクターによって運ばれる外因性MEMX遺伝子と胚幹細胞中の内因性MEMX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MEMX核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数千ベースの隣接するDNA（5'末端および3'末端の両方）が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら（1987）Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚幹細胞株に導入され（例えば、エレクトロポレーションによって）、この導入されたMEMX遺伝子が、内因性MEMX遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される（例えば、Liら（1992）Cell 69:915を参照のこと）。

【0212】

次いで、この選択された細胞を、動物（例えば、マウス）の胚盤胞へ注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley（1987）のTERATOCAARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、Robertson編、IRL、Oxford 113頁～152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フォスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの胚芽細胞中に相同組換えDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、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、この相同組換えDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的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WO93/04169。 10 20

【0213】

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記述については、例えば、Laksora、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種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。 30

【0214】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト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）は単離および誘導され、増殖サイクルから出、そしてG₀フェイズに入り得る。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る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。 40

【0215】

（薬学的組成物）

本発明のMEMX核酸分子、MEMXタンパク質、および抗MEMX抗体（これはまた、本明細書中で、「活性な化合物」とも呼ばれる）、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、および相同体が、投与に適した薬学的組成物に組み込まれ得る。このよう 50

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した、任意および全ての溶媒、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）（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、*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おけ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な化合物と不適合である範囲を除いて、組成物におけるその使用が考慮される。補助活性化合物はまた、組成物へ組み込まれ得る。

10

【0216】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口（例えば、静脈、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（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、張度の調節のための薬剤。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、アンプル、使い捨てシリンジ、あるいはガラスまたはプラスチックから作製される多用量のバイアル中に入れられ得る。

20

【0217】

注入使用に適した薬学的組成物は、滅菌水性溶液（ここで、水溶解性）または分散液、および滅菌の注入可能な溶液または分散液の即座の調製のための滅菌粉末を含む。静脈投与において、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌水、*Cremophor ELTM*（*BASF*、*Parsippany*、*N. J.*）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（*PBS*）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性でなければならず、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るべきである。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、分散液の場合に、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（*mannitol*））、ソルビトール、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注入可能組成物の長時間吸収は、組成物に吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を含ませることによってもたらされ得る。

30

40

【0218】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化合物（例えば、*MEMX*タンパク質あるいは抗*MEMX*抗体）を、適切な溶媒中に、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと

50

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、分散液は、活性化合物を、塩基性分散媒および上記で列挙される成分から必要とされる他の成分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散剤の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分および既に滅菌濾過されたその液剤からの任意のさらなる所望の成分の散剤を得る。

【0219】

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、マウスウォッシュ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、そしてさっと動かされ、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材料が、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）、*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*Sterotes*）；滑り剤（*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）。

10

20

【0220】

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。

【0221】

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、浸透されるバリアに適切な浸透剤が、処方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、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

30

【0222】

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ベースと共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

【0223】

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。エチレン酢酸ビニル、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、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、*Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc.* から市販され、手に入れることができる。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有する、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。

40

【0224】

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

50

される被験体のための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、この活性化化合物の特異的な特性、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化合物を調合する当該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。

【0225】

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、例えば静脈注射、局所投与（例えば、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、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐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。

10

【0226】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書と共の容器、包装、またはディスペンサーに含まれ得る。

【0227】

20

（スクリーニング方法および検出方法）

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、MEMXタンパク質（例えば、遺伝子治療用途における宿主細胞中の組換え発現ベクターによる）を発現するため、MEMX mRNA（例えば、生物学的サンプルにおいて）またはMEMX遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにMEMX活性を調節するために使用され得る。さらに、MEMXタンパク質は、MEMXタンパク質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MEMXタンパク質の不十分なもしくは過剰な産生によって、あるいはMEMX野生型タンパク質と比較して減少したもしくは異常な活性を有するMEMX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MEMX抗体が、MEMXタンパク質を検出して単離するため、およびMEMX活性を調節するために使用され得る。

30

【0228】

本発明は、さらに、本明細書中で記載されるような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、および上述の処置のためのそれらの使用に関する。

【0229】

（I. スクリーニングアッセイ）

本発明は、モジュレーター（すなわち、MEMXタンパク質に結合するかあるいは例えば、MEMXタンパク質発現またはMEMXタンパク質活性に刺激効果または阻害効果を有する候補物または試験の化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣体、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」とも呼ばれる）を提供する。本発明はまた、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにおいて同定された化合物を包含する。

40

【0230】

1つの実施形態において、本発明は、MEMXの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、またはそれら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任意の多数のアプローチを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平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

50

一法；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）。

【0231】

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。

10

【0232】

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 U. S. A. 90:6909；Erbら(1994) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 91:11422；Zuckermannら(1994) J Med Chem 37:2678；Chora(1993) Science 261:1303；Carelら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2059；Carelら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061；Galloppら(1994) J Med Chem 37:1233。

20

【0233】

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）、孢子（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；Cwirllaら(1990) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 87:6378～6382；Felici (1991) J Mol Biol 222:301～310；Ladner、米国特許第5,233,409号）において示され得る。

30

【0234】

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MEMX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、MEMX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MEMX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標識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MEMX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、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³H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MEMX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、MEMXと結合する公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

40

50

を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がMEMX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MEMXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、MEMX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。

【0235】

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MEMX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、MEMX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、MEMX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、MEMXタンパク質が、MEMX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、MEMXタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、MEMX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、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。MEMX標的分子は、非MEMX分子あるいは本発明のMEMX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、MEMX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通して細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合MEMX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分子のMEMXとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

【0236】

MEMXタンパク質がMEMX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、MEMXタンパク質がMEMX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、 IP_3 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的に連結されたMEMX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。

【0237】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、MEMX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MEMX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、MEMX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、MEMXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、MEMXを結合する公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MEMX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MEMX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、公知の化合物と比較して、MEMX、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。

【0238】

さらに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、MEMX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MEMX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MEMXの活性を調節

する能力の決定は、例えば、MEMXタンパク質が、MEMX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MEMXタンパク質の活性を調節する能力の決定は、MEMXタンパク質が、MEMX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。

【0239】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、MEMXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を、MEMXタンパク質を結合する公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MEMX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MEMXタンパク質と相互作用する能力の決定は、MEMXタンパク質が、MEMX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。

10

【0240】

本発明の無細胞アッセイは、MEMX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MEMXタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、MEMX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望ましくあり得る。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）ジメチルアンモニオ-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）ジメチルアンモニオ-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。

20

30

【0241】

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、MEMX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用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の、MEMX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、MEMX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-MEMX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吸着されない標的タンパク質、またはMEMX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、複合体形成に貢献する条件下（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に続いて、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MEMX

40

50

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。

【0242】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、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、MEMX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。ビオチニル化MEMX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、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.）、そしてストレプトアビジンで被覆した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、MEMXタンパク質、または標的分子と反応性であるがMEMX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MEMXタンパク質が、抗体の結合によってウェル内にトラップされ得る。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のものに加えて、MEMX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MEMX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。

10

【0243】

別の実施形態において、MEMX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MEMX 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MEMX 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MEMX 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、MEMX 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、MEMX 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、MEMX 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、MEMX 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、MEMX 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MEMX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、MEMX 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。

20

30

【0244】

本発明のなお別の局面において、MEMXタンパク質を、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「ベイト（餌）（bait）タンパク質」として使用して（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 Biotechnology 14:920-924；Iwabuchiら、1993 Oncogene 8:1693-1696；およびBrent WO94/10300を参照のこと）、MEMX（「MEMX結合タンパク質」または「MEMX-bp」）に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてMEMX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MEMX結合タンパク質はまた、例えば、MEMX経路の上流または下流エレメントとしてMEMXタンパク質によるシグナル伝達に関与するようである。

40

【0245】

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、MEMXをコードする遺伝子が、公知の転写因子（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（「プレイ（捕食）」または「サンプル」）をコードするDNA配列が、その公知

50

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。「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して、MEMX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、非常に近接される。このように近接されることにより、その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）の転写を可能にする。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を単離および使用して、そしてMEMX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獲得し得る。

【0246】

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。

10

【0247】

（I I . 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（限定はされない）、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。これらのいくつかの適用は、以下の節において記載される。

【0248】

（染色体マッピング）

20

一旦遺伝子の配列（または配列の一部）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、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15に示されるMEMX配列の一部またはフラグメント、あるいはそのフラグメントはまたは誘導体を用いて、それぞれ、MEMX遺伝子の位置を染色体上にマッピングし得る。MEMX配列を染色体にマッピングすることは、これらの配列を疾患に関連する遺伝子と相関付ける際の重要な第一工程である。

【0249】

簡潔には、MEMX遺伝子は、MEMX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。MEMXのコンピューター分析が、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（従って、これは、増幅プロセスを複雑にする）を迅速に選択するために使用され得る。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。MEMX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。

30

【0250】

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、ヒト細胞およびマウス細胞）を融合することにより調製される。ヒトおよびマウスの細胞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、それらが特定の酵素を欠いているので増殖できないが、ヒト細胞が増殖できる培地を使用することにより、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）。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。

40

【0251】

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

50

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。MEMX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ことにより、二次位置決定 (sublocalization) が、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。

【0252】

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塩基ほどの長さの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、Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES (Pergamon Press, New York 1988) を参照のこと。

10

【0253】

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、または試薬パネルが、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。

20

【0254】

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が、遺伝子マップデータと相関され得る。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) において見い出される。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。

30

【0255】

さらに、MEMX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原因因子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きるか、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) を最初に探索する工程を包含する。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。

40

【0256】

(組織型決定 (tissue typing))

本発明のMEMX配列は、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、そしてサザンブロット上でプローブされて、同定のために固有のバンドを生成する。本発明の配列は、米国特許第5,272,057号に記載の制限フラグメント長多型 (RFLP) のためのさらなるDNAマーカーとして有用である。

50

【0257】

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MEMX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、これを配列決定し得る。

【0258】

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配列の固有のセットを有するので、固有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MEMX配列は、ヒトゲノムの部分を固有に表す。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、RFLPを含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に起因する。

10

【0259】

本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度、標準（これに対して、個体由来の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、3、5、7、9、11、13、または15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。

20

【0260】

(予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム学(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、MEMXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにMEMXの活性を、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)状況下で決定し、これによって、個体が、異常なMEMXの発現または活性に関連する疾患または障害に罹患しているか否か、あるいはこの障害を発症するリスクがあるか否かを決定する。本発明はまた、個体が、MEMX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否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、MEMX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MEMX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それに関連した障害の発症の前に個体を予防的に処置する。

30

【0261】

本発明の別の局面は、個体におけるMEMXタンパク質、核酸の発現またはMEMX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薬剤を選択する(本明細書において「薬物ゲノム学」とよばれる)。薬物ゲノム学は、個体の遺伝型(例えば、特定の薬剤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薬剤(例えば、薬物)の選択を可能にする。

40

【0262】

本発明のなお別の局面は、臨床試験におけるMEMXの発現または活性に対する因子(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。

【0263】

50

これらの因子および他の因子は、以下の節においてさらに詳細に記載される。

【0264】

(I. 診断アッセイ)

生物学的サンプルにおけるMEMX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MEMXタンパク質またはMEMX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、MEMX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。MEMXのmRNAまたはゲノムDNAを検出するための薬剤は、MEMXのmRNAまたはゲノム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MEMX核酸（例えば、配列番号1、3、5、7、9、11、13、または15の核酸）またはその部分（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、そしてストリンジェントな条件下でMEMX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）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中に記載される。

10

【0265】

MEMXタンパク質を検出するための1つの薬剤は、MEMXタンパク質と結合し得る抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。本発明のタンパク質に対する抗体は、タンパク質の局在および／または定量化に関連する、当該分野で公知の方法において使用され得る（例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど）。所定の実施形態では、タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログは、薬理学的に活性な組成物として使用される。

20

【0266】

本発明のタンパク質に特異的な抗体は、標準技術（例えば、免疫親和性クロマトグラフィまたは免疫沈降）によって、タンパク質を単離するために用いられ得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製および宿主細胞において発現される組換え的に産生された抗原の精製を容易にし得る。さらに、抗原タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて（例えば、細胞の溶解液または細胞上清における）抗原タンパク質を検出し得る。このタンパク質に対する抗体は、例えば、所定の処置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カップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、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；適切な補欠分子団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；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；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；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、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 ^3H が挙げられる。

30

40

【0267】

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、 F_{ab} または $\text{F}(\text{ab}')_2$ ）が使用され得る。本明細書中で使用される場合、用語「標識（された）」とは、プロー

50

ブまたは抗体に関して、そのプローブもしくは抗体への検出可能な物質のカップリング（すなわち、物理的に連結する）による、そのプローブまたは抗体の直接標識、ならびに、直接標識される別の試薬との反応性による、そのプローブもしくは抗体の間接的標識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る一次抗体の検出、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なビオチンでのDNAプローブの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、生物学的サンプル中のMEMXのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、MEMX 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。MEMXタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（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。MEMX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、MEMX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MEMX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。この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。

10

【0268】

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。

20

【0269】

1つ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、MEMXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムを検出し得る化合物または薬剤と接触させ、その結果、MEMXのタンパク質、mRNAまたはゲノム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MEMXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるMEMXのタンパク質、mRNA

30

【0270】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるMEMX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MEMXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物または薬剤；そのサンプルにおいてMEMXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおけるMEMXの量を標準と比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内にパッケージングされ得る。このキットは、さらに、MEMX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説明書を備え得る。

【0271】

（II．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、MEMX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。MEM1についてのこのような障害は、免疫学的状態、ウィルス感染、神経性疾患、アルツハイマー病またはパーキンソン病、癌（例えば、乳癌または神経芽腫）、腎臓病学、および女性の生殖保健を含む。MEM4についてのこのような障害は、肺および／または脳（例えば、精神分裂病、または頭部傷害による神経損傷）を含む障害を含む。MEM5についての障害は、心筋および他の筋肉障害（例えば、不整脈）、凝固不全、およびコバラミン不全（例えば、悪性貧血）を含む。MEM6についてのこのような障害は、グリコーゲン代謝の制御不全（例えば、糖尿病）に起因する障害を含む。

40

50

MEM7およびMEM8についてのこのような障害は、視覚関連障害（例えば、角膜軟化）、癌、および他の新形成病理を含む。

【0272】

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、MEMX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。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、MEMX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MEMX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

10

【0273】

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MEMX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

20

【0274】

本発明の方法はまた、MEMX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、MEMX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MEMX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）MEMX遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；（ii）MEMX遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；（iii）MEMX遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、（iv）MEMX遺伝子の染色体再配置；（v）MEMX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）MEMX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）MEMX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）MEMXタンパク質の非野生型レベル、（ix）MEMX遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに（x）MEMX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、MEMX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。

30

40

【0275】

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

50

ば、Landegranら(1988) Science 241:1077-1080; およびNakazawaら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 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、MEMX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、MEMX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、MEMX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。

10

20

30

40

50

【0276】

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 β 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。

【0277】

代替の実施形態において、サンプル細胞からのMEMX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。

【0278】

他の実施形態において、MEMX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(例えば、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、MEMX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。

【0279】

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、MEMX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルMEMX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. Sci. USA 74:560またはSanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 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、Naever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。 10

【0280】

MEMX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、切断薬剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる(例えば、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MEMX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、S₁ス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。次いで、そのミスマッチ領域の消化後、得られた材料を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさで分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら、1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleeb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 20 30

【0281】

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MEMX 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Aを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシダーゼは、G/TミスマッチでTを切断する。例えば、Hsuら、1994. Carcinogenesis 15:1657~1662を参照のこと。例示的な実施形態に従って、MEMX配列(例えば、野生型MEMX配列)に基づくプローブは、試験細胞(単数または複数)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。 40

【0282】

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、MEMX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、一本鎖配座多型(SSCP)は、変異体核酸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。例えば、Oritaら、1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA:86:2766; Cotton、1993. Mutat. Res. 285:125~144; Ha 50

y a s h i、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MEMX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つの塩基変化さえも検出し得る。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、二次構造が、配列中の変化に対してより感受的である、(DNAよりもむしろ)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。

10

【0283】

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に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。

20

【0284】

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。

30

【0285】

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)(例えば、Gibbsら、1989. *Nucleic Acids Res.* 17: 2437~2448を参照のこと)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(例えば、Prossner(1993) *Tibtech.* 11: 238を参照のこと)。さらに、変異の領域において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、特定の部位で既知の変異の存在を検出することを可能にする。

40

【0286】

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

50

って実施され得、これは、例えば、MEMX遺伝子に関与する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。

【0287】

さらに、MEMX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。

【0288】

（III. 薬理ゲノム学（Pharmacogenomics））

MEMX活性（例えば、MEMX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、またはモジュレーターは、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、異常なMEMX活性に関連する障害を処置（予防的または治療的に）するために個体に投与され得る。例えば、MEM1に関するこのような障害として、免疫学的状態、ウイルス感染、神経学的障害、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病、癌（例えば、乳癌もしくは神経芽腫）、腎臓病、および女性の生殖の健康（female reproductive health）。MEM4に関する障害として、肺および/または脳に関係している障害が挙げられる（例えば、精神分裂病、または頭部外傷に続く神経損傷）。MEM5に関する障害として、心臓および他の筋肉障害（例えば、不整脈）、凝固欠乏症（clotting deficiencies）、およびコバラミン欠乏症（例えば、悪性貧血）が挙げられる。MEM6に関するこのような障害として、グリコゲン代謝の調節不全に起因する障害（例えば、糖尿病）が挙げられる。MEM7およびMEM8に関するこのような障害として、視覚関連障害（例えば、角膜軟化）、癌、および他の腫瘍性の病状が挙げられる。

10

20

30

【0289】

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、MEMXタンパク質の活性、MEMX核酸の発現、あるいは個体におけるMEMX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（単数または複数）を選択し得る。

【0290】

薬理ゲノム学は、罹患された人において変更された薬物の性質および異常な作用に起因する、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; 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。遺伝的状态は、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か（変更された薬物作用）、または遺伝的状态は、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（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取（consumption）後の溶血である。

40

【0291】

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

50

多型の発見は、何故に、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または薬物の標準的かつ安全な用量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かという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））で発現される。PMの罹患率は、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。

10

【0292】

従って、MEMXのタンパク質の活性、MEMXの核酸の発現、あるいは個体におけるMEMXの遺伝子の変異内容を決定されて、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MEMX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。

20

【0293】

（IV．臨床試験の間の効果のモニタリング）

MEMX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においてのみならず、臨床試験においてもまた適用され得る。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薬剤が、MEMXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加するため、またはMEMX活性をアップレギュレートする効力を、減少したMEMX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MEMXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、MEMXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはMEMXの活性をダウンレギュレートする効力を、増加したMEMX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MEMXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。このような臨床試験において、MEMXの発現または活性、および好ましくは、例えば、細胞性増殖障害または免疫障害、または上記個々の節1～14に記載するような、MEMXに特異的な疾患に関連した他の遺伝子が、「リードアウト（読み出し）（*read out*）」または特定の細胞の免疫応答のマーカーとして使用され得る。

30

40

【0294】

例えば、限定の目的ではないが、MEMXを含む遺伝子（これは、MEMX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、薬物または小さい分子）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。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MEMXおよびこの障害に関連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

50

いはMEMX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。

【0295】

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、ペプチド模倣物、核酸、小さい分子、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、MEMX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、MEMX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MEMX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（単数または複数）におけるMEMX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MEMXの発現または活性を増加するために（すなわち、この薬剤の効力を増加するために）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MEMXの発現または活性を減少するために（すなわち、この薬剤の効力を減少するために）望ましくあり得る。

10

20

（処置方法）

本発明は、異常なMEMXの発現または活性に関連する障害の危険性がある（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。例えば、活性の異常なMEM1の発現に関連する障害としては、ウイルス感染、神経学的障害（例えば、アルツハイマー病もしくはパーキンソン病）、癌（例えば、乳癌もしくは神経芽腫）、および種々の腎臓障害が挙げられるが、これに限定されない。活性の異常なMEM2、MEM3、およびMEM4の発現に関連する障害としては、精神学的疾患（例えば、精神分裂病）、または頭部の外傷に続く減数する神経損傷（reducing neuronal damage）（が挙げられるが、これに限定されない。異常なMEM5の発現に関連する障害として、心臓および他の筋肉障害（例えば、不整脈障害）、凝固欠乏症における凝固因子XI（cotting Factor XI in cotting deficiencies）、およびコバラミン欠乏症（例えば、悪性貧血）が挙げられるが、これに限定されない。異常なMEM6発現に関連する障害として、グリコゲン代謝関連障害（例えば、糖尿病および関連障害）が挙げられるが、これに限定されない。異常なMEM7およびMEM8に関連する障害として、視覚関連障害（例えば、角膜軟化）および癌および／または類似した腫瘍性の病状が挙げられるが、これに限定されない。

30

【0296】

これらの処置方法は、以下で、さらに十分に検討する。

40

【0297】

（I．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」

50

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、C a p e c c h i、1989、S c i e n c e 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））。

【0298】

（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を増加させるアゴニスト。

10

【0299】

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について、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、免疫沈降後の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、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）。

20

【0300】

（I. 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MEMXの発現または活性と関連する疾患または状態を、MEMXの発現または少なくとも1つのMEMX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。異常なMEMX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MEMX異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このMEMX異常の型に依存して、例えば、MEMXアゴニスト薬剤またはMEMX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。

30

【0301】

（II. 治療方法）

本発明の別の局面は、治療目的のためにMEMX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MEMX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。MEMX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、MEMXタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、MEMXペプチド模倣物、または他の小さい分子のような、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、1つ以上のMEMXタンパク質活性を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なMEMXタンパク質、およびその細胞に導入されたMEMX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、MEMX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MEMX核酸分子、および抗MEMX

40

50

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、MEMX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、MEMX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、MEMX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、MEMX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。

10

【0302】

MEMX活性の刺激は、MEMX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MEMX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、被験体が免疫不全疾患（例えば、AIDS）を有する場合である。

【0303】

本発明の抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および完全なヒト抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。このような薬剤は、一般的に、被験体における疾患および病理を処置または予防するために使用される。抗体調製物（好ましくは、その標的抗原について高い特異性および高い親和性を有するもの）は、被験体に対して投与され、そして一般的に、その標的との結合に起因して効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題の標的抗原との間の相互作用の特異的性質に依存して、2つの種類のうちの1つであり得る。第1の例では、抗体の投与は、標的とそれが天然に結合する内因性リガンドとの結合を抑止または阻害し得る。この場合、抗体は、標的に結合し、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクし、ここでそのリガンドは、エフェクター分子として働く。従って、レセプターは、リガンドが原因となるシグナル伝達経路を媒介する。

20

【0304】

あるいは、その効果は、標的分子上のエフェクター結合部位への結合の効力によって、抗体が生理学的結果を誘発するものであり得る。この場合、標的（存在し得ないかまたは疾患もしくは病理を欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター）が、代理のエフェクターリガンドとして抗体を結合して、レセプターによって、レセプターに基づくシグナル伝達事象を開始する。

30

【0305】

治療的に有効な量の本発明の抗体は、治療目的を達成するために必要とされる量を一般的にいう。上記のように、これは、いくつかの場合において標的の機能を妨害し、そして他の場合において生理学的応答を促進する、抗体とその標的抗原の間の結合相互作用であり得る。投与されるために必要とされる量は、その特異的抗原についての抗体の結合親和性にさらに依存し、そしてまた、その量は、投与される抗体が、その抗体が投与される自由な体積の他の被験体から枯渇される速度に依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療的有効用量の一般的な範囲は、非限定的な例として、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重である。一般的な投薬の頻度は、例えば、毎日2回～1週間に1回の範囲であり得る。

40

【0306】

（III. 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。

【0307】

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型（単数ま

50

たは複数)の代表的な細胞で行われ、所定の治療剤がこの細胞型(単数または複数)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。

【0308】

(実施例)

(実施例1:種々の細胞および組織におけるMEM5の発現のリアルタイム定量的(RTQ)PCR評価)

MEM5(国際識別番号16418841)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的PCR(TAQMAN(登録商標))によって正常サンプルおよび腫瘍サンプルにおいて評価した。本実施例に含まれる表において、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=non-sm=非小(non-Small)

squam=鱗状(squamous)

pl. eff=pl. effusion=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)。

【0309】

96のRNAサンプルを、 β アクチンおよびGAPDHのような内部基準について正規化した。RNA(~ 50 ngの合計または ~ 1 ngのポリA⁺)を、TAQMAN(登録商標)Reverse Triascription Reagents Kit(PE Biosystems; Foster City, CA; カタログ番号N808-0234)を使用し、そして製造者のプロトコルに従ってランダムヘキサマーを使用してcDNAに転換した。反応を20 μ lで行い、そして30分間48 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いで、cDNA(5 μ l)を、TAQMAN(登録商標)反応のために、 β アクチンおよびGAPDH TAQMAN(登録商標)Assay Reagents(PE Biosystems; それぞれ、カタログ番号431088Eおよび4310884E)およびTAQMAN(登録商標)Universal PCR Master Mix(PE Biosystems; カタログ番号4304447)のような内部基準を使用して、製造者のプロトコルに従って、分離プレートに移した。25 μ lの総反応量で、以下のパラメーターを使用して反応を行った: 2分間50 $^{\circ}$ C; 10分間95 $^{\circ}$ C; 15秒間95 $^{\circ}$ C; および1分間60 $^{\circ}$ C(40サイクル)。結果を、ログスケールを使用してCT値(所定のサンプルが、蛍光の閾値レベルで交差するサイクル)として記録した。ここで、所定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、 $2^{\Delta CT}$ として示された。次いで、このRNAの差の逆数を取り、そして100を掛けることによって相対発現パーセントを得た。 β アクチンおよびGAPDHから得られた平均のCT値を、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を、それらの β アクチン/GAPDH平均CT値に従って、このサンプルと比較して希釈した。

【0310】

正規化RNA(5 μ l)を、cDNAに転換し、そしてOne-Step RT-PCR Master Mix Reagents(PE Biosystems; カタログ番

10

20

30

40

50

号4309169)および遺伝子特異的プライマーを使用して、製造者の指示に従って、TaqMan(登録商標)を通じて分析した。プローブおよびプライマーを、入力として標的配列を使用するPerkin Elmer Biosystem's Primer Express Softwareパッケージ(Apple Computer's Macintosh PCのためのVersion 1)または類似のアルゴリズムに従って、各アッセイについて設計した。デフォルトの設定を、反応条件について使用し、そして以下のパラメーターをプライマーの選択の前に設定した:プライマー濃度=250 nM;プライマー溶解温度(T_m)範囲=58°~60°C;プライマー最適 T_m =59°C;最大プライマー差異=2°C;プローブは、5'末端Gを有さない;プローブ T_m は、プローブ T_m よりも10°Cより高くなければならない;そしてアンプリコンのサイズは、75 bp~100 bpでなければならない。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、結合していない色素を除去するためにHPLCによって二回精製し、そしてそれぞれプローブの5'末端および3'末端に対するレポーターおよびクエンチャー色素の結合を確認するために質量分析によって評価した。その最終濃度は、以下であった:順方向および逆方向プライマー=それぞれ900 nM;およびプローブ=200 nM。

【0311】

以下のPCR条件を用いた。各組織および各細胞株由来の正規化されたRNAを、96ウェルの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(標的クローン特異的プローブおよび標的プローブで多重化された別の遺伝子特異的プローブ)を含むPCR反応混合物をPE Biosystems 7700のための1X TaqManTM PCR Master MIXを使用して調製した。この混合物は、以下を含んだ:5 mM MgCl₂;dNTP(dA、dG、dC、およびdUを1:1:1:2の比で);0.25 U/ml AmpliTaq GoldTM(PE Biosystems);0.4 U/μl RNaseインヒビター;および0.25 U/μl 逆転写酵素。逆転写を48°Cで30分間行い、続いて、以下のような増幅/PCRサイクルを行った:95°Cで10分間;次いで95°Cで15秒間および60°Cで1分間の40サイクル。

【0312】

2つのサンプルパネルを本実施例において使用した。パネル1は、そのウェルがヒト悪性組織(すなわち、腫瘍)から樹立された種々のヒト細胞株から単離されたRNA/cDNAを含む、96ウェルプレート(通常、2つのコントロールウェル、94の試験サンプル)である。これらの細胞株は、それらの腫瘍形成能、転移可能性、薬物耐性、侵襲性可能性および他の癌関連特性に関して、学術研究機関および商業部門の両方の研究者によって広く特徴付けられてきた。これらは、抗癌剤および有望な治療ストラテジーの臨床前評価のための適切な道具として役立つ。これらの種々のヒト癌細胞株由来のRNAが、国立癌研究所(USA)の発症治療部門(DTB)から単離および獲得された。それらの生物学的行動、遺伝子発現、および種々の細胞障害性薬剤に対する耐性に関する基本的情報は、DTB(<http://dtp.nci.nih.gov/>)によって提供される。

【0313】

さらに、RNA/cDNAを、死亡した高齢者または急死した犠牲者(事故など)に対して行なわれたヒト剖検由来の種々のヒト組織から獲得した。これらの組織が疾患のないことを確認した。ならびにClontech, Inc.、Research Genetics、およびInvitrogenのような種々の高品質の販売元から購入した。

【0314】

すべてのサンプルからのRNA完全性は、ガイドとしての28Sおよび18SリボソームRNA染色強度比率(2:1~2.5:1 28S:18S)および変性産物の指標となる低分子量RNAの非存在を確認するアガロースゲル電気泳動の視覚的評価によって、品質について制御される。

【0315】

10

20

30

40

50

パネル 2 は、国立癌研究所の共同ヒト組織ネットワーク（CHTN）または国立疾病研究所（NDRI）と密接に協力した外科医の作業によって獲得されたヒト組織から単離された RNA/cDNA を含む 96 ウェルプレート（通常、2 つのコントロールウェル、94 の試験サンプル）である。獲得された組織は、ヒト悪性腫瘍に由来し、そして、この場合に多数の悪性組織が「調和したマージン（matched margins）」を有することを示した。この腫瘍組織および「調和したマージン」は、2 人の独立した病理学者（外科的病理学者および再び NDRI または CHTN の病理学者）によって評価された。この分析は、腫瘍分化グレードの全体の組織病理学的評価を提供する。さらに、大部分のサンプルは、患者の臨床学的段階に関する情報を提供する本来の外科的病理学報告を含む。これらの調和したマージンは、手術区域の周囲の組織（すなわち、すぐ近接）から採取される（正常な隣接組織について、「NAT」と命名される）。さらに、RNA または cDNA を、死亡した高齢者または急死した犠牲者（事故など）に対して行なわれたヒト剖検由来の種々のヒト組織から獲得した。これらの組織が疾患のないことを確認し、そして Clontech, Research Genetics、および Invitrogen のような種々の高品質の販売元から購入した。

10

【0316】

再び、全てのサンプルからの RNA 完全性を、ガイドとして 28S および 18S rRNA 染色強度比率（2:1 ~ 2.5:1 28S:18S の比）を使用し、そして変性産物の指標となる低分子量 RNA の非存在を確認することによって、アガロースゲル電気泳動の視覚的評価によって、品質について制御した。単一のエキソンの長さによって増幅するように設計されたプローブおよびプライマーセットを使用して、逆転写酵素の非存在下で、反応物の泳動によってゲノム DNA 混入について、サンプルを品質制御した。

20

【0317】

パネル 1 を利用する以下の MEM5 配列（国際識別番号 16418841）の RTQ PCR を、表 2 において指定されるプライマー-プローブセット Ag765 を使用して、表 3 に示した。

【0318】

【表 2】

表 2

30

プライマー	配列	長さ	開始位置	配列番号
順方向	5'-CCAACGTGAAGGGAGCTATAT-3'	21	923	17
アローナ	TET-5'-TGCTGACACCACTACACATGTCACAA-3'-TAMRA	26	953	18
逆方向	5'-CCAGCCCCTAAAATTCTCATC-3'	21	986	19

【0319】

【表 3】

40

表 3

細胞供給源	相対発現 % 1.2tm717t	相対発現 % 1.2tm917t	相対発現 % 1.2tm971t	細胞供給源	相対発現 % 1.2tm717t	相対発現 % 1.2tm917t	相対発現 % 1.2tm971t
内皮細胞	22.5	22.5	22.1	腎臓 ca. 786-0	17.6	17.6	5.3
内皮細胞 (乳管)	2.0	2.0	1.3	腎臓 ca. A498	27.2	27.2	22.1
腎臓 ca.	27.7	27.7	32.5	腎臓 ca. RXF393	2.8	2.8	2.5
CAPAN 2	11.8	11.8	3.9	腎臓 ca. ACHN	8.7	8.7	6.9
副腎 (新ト+)	12.5	12.5	14.9	腎臓 ca. UO-31	16.6	16.6	4.5
甲状腺	24.8	24.8	18.7	腎臓 ca. TK-10	20.3	20.3	9.1
唾液腺	35.1	35.1	33.9	肝臓	6.8	6.8	6.9
下垂体	33.7	33.7	44.1	肝臓 (胎児)	12.9	12.9	12.8
肝臓 (胎児)	1.7	1.7	3.2	肝臓 ca. (肝臓細胞) HepG2	8.8	8.8	3.2
肝臓 (全株)	11.9	11.9	13.0	肺	11.8	11.8	10.7
肺 (胎児)	2.9	2.9	4.4	肺 (胎児)	10.9	10.9	12.6
肺 (小脳)	6.6	6.6	10.0	肺 ca. (small cell)	26.2	26.2	16.5
肺 (海鳥)	6.7	6.7	8.9	肺 ca. (small cell)	28.7	28.7	9.2
肺 (視床)	6.1	6.1	5.5	肺 ca. (s.cell var.)	12.5	12.5	7.7
大脳皮質	7.6	7.6	0.0	肺 ca. (large cell) NCI-H460	23.7	23.7	17.1
脊髄	7.1	7.1	10.7	肺 ca. (non-sm. cell) A549	12.6	12.6	6.5
CNS ca. (glia/astro)	22.9	22.9	22.9	肺 ca. (non-s.cell)	7.3	7.3	6.0
U87-MG	33.5	33.5	25.9	肺 ca. (non-s.cell)	11.5	11.5	0.0
CNS ca. (glia/astro)	7.8	7.8	6.0	肺 ca. (non-s.cl)	44.1	44.1	24.7
U-118-MG	26.1	26.1	23.3	肺 ca. (squam.)	15.9	15.9	8.1
CNS ca. (astro)	16.7	16.7	11.6	肺 ca. (squam.)	21.6	21.6	16.4
SW1783	19.6	19.6	12.5	乳 腺	24.8	24.8	24.7
CNS ca. (astro)	65.1	65.1	27.0	乳房 ca.* (pl. effusion) MCF-7	11.7	11.7	7.6
CNS ca. (glia)	17.2	17.2	9.0	乳房 ca.* (pl.cf)	14.3	14.3	13.4
SNB-19	22.1	22.1	20.0	乳房 ca.* (pl. effusion) T47D	11.0	11.0	12.3
CNS ca. (glia) U251	57.8	57.8	57.4	乳房 ca. BT-549	21.2	21.2	15.3
CNS ca. (glia) SF-295	100.0	100.0	100.0	乳房 ca. MDA-N	10.8	10.8	13.4
心臓							
骨格筋							

10

20

30

(表3の続き)

(注100%)						
腎臓	7.2	7.2	7.2	卵巣 ca.	2.2	0.3
月経線	5.6	5.6	4.2	OVCAR-3	15.5	12.5
肝臓	6.0	6.0	7.4	卵巣 ca.	5.0	5.0
リンパ節	7.0	7.0	7.7	OVCAR-4	12.2	6.4
多発性骨髄腫	2.2	2.2	1.3	卵巣 ca.	15.3	5.6
骨	12.4	12.4	15.8	OVCAR-5	20.5	12.9
小腸	23.5	23.5	17.8	OVCAR-8	30.6	26.6
結腸 ca. SW480	15.6	15.6	6.3	卵巣 ca. IGROV-1	9.2	6.3
結腸 ca.* (SW480 met) SW620	38.4	38.4	15.9	子宮	13.7	15.2
結腸 ca. HT29	8.5	8.5	3.1	卵巣 ca.* (ascites) SK-OV-3	20.6	16.6
結腸 ca. HCT-116	20.9	20.9	10.5	前立腺 ca.* (骨) PC-3	23.7	15.5
結腸 ca. Caco-2	11.5	11.5	4.5	乳癌	29.5	23.8
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	3.9	3.9	0.4	黒色腫 Hs688(A).T	12.0	8.4
結腸 ca. HCC-2998	35.4	35.4	21.6	黒色腫*(met) Hs688(B).T	15.9	11.0
骨 ca.* (肝臓) met) NCI-N87	25.5	25.5	21.0	黒色腫 UACC-62	1.9	1.0
骨髄	23.0	23.0	22.5	黒色腫 M14	14.4	1.7
気管	9.4	9.4	10.7	黒色腫 LOX IMVI	8.3	2.1
腎臓	12.9	12.9	13.1	黒色腫*(met) SK-MEL-5	14.1	11.2
腎臓 (胎児)	19.0	19.0	8.3	脂肪肉	2.1	1.0

10

20

表3の結果は、MEM5の配列が、広範な種々の正常細胞株および癌細胞株において発現されることを示す。正常な組織と関連して、特定の脳腫瘍（例えば、CNS ca. (glioma) SNB-19）、結腸癌（例えば、結腸 ca. * (SW480 met) SW620）、および肺癌（肺 ca. (non-cl) NCI-H522）においてより高度に発現される。

30

【0320】

パネル2を用いて得られたMEM5についてのさらなる結果を、表4に示す。

【0321】

【表4】

表 4

組織系源	相対的 発現, % 2tm972t	組織系源	相対的 発現, % 2tm972t
83786 腎臓 Ca. 核転移 2 (ODO4338)	15.4	87492 卵巣癌 (ODO4768-07)	78.5
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3868)	2.1	87493 卵巣 NAT (ODO4768-08)	11.7
83220 CC NAT (ODO3868)	11.7	腎臓癌 INVITROGEN A302173	7.7
83221 CC Gr.2 乳腺転移 (ODO3868)	11.7	腎臓癌 Research Genetics RNA 1023	0.0
83222 CC NAT (ODO3868)	3.4	乳腺癌 Clontech 9100268	2.8
83235 CC Mod Diff (ODO3920)	28.9	乳腺癌 INVITROGEN A209073	1.9
83236 CC NAT (ODO3920)	30.8	乳腺癌 Res. Gen. 1024	21.8
83237 CC Gr.2 乳腺転移 (ODO3921)	10.4	乳腺 NAT Clontech 9100265	0.1
83238 CC NAT (ODO3921)	1.8	乳腺 NAT INVITROGEN A209073	5.1
83239 肺から筋肉への転移 (ODO4288)	1.5	GENPAK 乳腺 064008	17.3
83240 筋肉 NAT (ODO4288)	18.4	胃癌 Clontech 9080395	14.8
83241 部分胃中腸転移 (ODO4309)	9.6	胃癌 Clontech 9080397	3.0
83242 肝臓 NAT (ODO4309)	22.1	胃癌 GENPAK 064005	48.6
83255 遠隔Metから肝臓への転移 (ODO4310)	54.7	腎臓癌 Clontech 8120807	0.0
83256 肝臓 NAT (ODO4310)	25.2	腎臓癌 Clontech 8120813	0.3
83787 腎臓 NAT (ODO4338)	32.8	腎臓癌 Clontech 9010320	0.4
83788 腎臓 Ca. 核転移 1/2 (ODO4339)	59.1	腎臓 NAT Clontech 8120808	0.1
83789 腎臓 NAT (ODO4339)	50.4	腎臓 NAT Clontech 8120814	0.0
83790 腎臓 Ca. 明細胞型 (ODO4340)	100.0	腎臓 NAT Clontech 9010321	0.1
83791 腎臓 NAT (ODO4340)	39.2	肝臓癌 GENPAK 064003	23.8
83792 腎臓 Ca. 核転移 3 (ODO4348)	24.2	肝臓癌 Research Genetics RNA 1025	0.8
83793 腎臓 NAT (ODO4348)	25.4	肝臓癌 Research Genetics RNA 1028	0.1
84136 肺転移 (ODO3126)	5.9	NAT 胃 Clontech 9080359	14.3
84137 肺 NAT (ODO3126)	9.7	NAT 胃 Clontech 9080394	11.4
84138 肺 NAT (ODO4321)	4.8	NAT 胃 Clontech 9080398	5.4
84139 乳腺腫瘍から肺への転移 (ODO4321)	28.2	正常膀胱 GENPAK 081001	18.8
84140 前立腺癌 (ODO4410)	28.8	正常乳房 GENPAK 081019	5.4
84141 前立腺 NAT (ODO4410)	41.8	正常膀胱 GENPAK 081003	17.2
84871 肺癌 (ODO4404)	2.0	正常腎臓 GENPAK 081008	11.8
84872 肺 (ODO4404)	0.0	正常肝臓 GENPAK 081009	28.4
84875 肺癌 (ODO4585)	55.9	正常卵巣 GENPAK 081010	10.9
84877 乳癌 (ODO4586)	7.2	正常卵巣 Res. Gen.	0.6
85950 肺癌 (ODO4237-01)	7.0	正常前立腺 Clontech A+ 8548-1	3.9
85970 肺 NAT (ODO4237-02)	12.2	正常胃 GENPAK 081017	12.9
85973 腎臓癌 (ODO4450-01)	20.6	正常甲状腺 Clontech A+ 8570-1**	10.3
85974 腎臓 (ODO4450-03)	40.6	正常子宮 GENPAK 081018	12.6
85975 乳癌 (ODO4590-01)	31.6	卵巣癌 GENPAK 084008	9.3
85976 乳癌 Mets (ODO4590-03)	39.5	対になった肝臓癌組織 6004-T	0.4
87070 乳癌転移 (ODO4655-05)	28.6	対になった肝臓癌組織 6005-T	1.3
87071 腎臓癌 (ODO4718-01)	28.3	対になった肝臓癌組織 6004-N	9.0
87072 膀胱正常に隣接 (ODO4718-03)	1.8	対になった肝臓癌組織 Research Genetics RNA	0.8
87073 前立腺癌 (ODO4720-01)	52.5	甲状腺癌 GENPAK 084010	17.8
87074 前立腺 NAT (ODO4720-02)	6.2	甲状腺癌 INVITROGEN A302152	27.7
87472 乳腺から肺への転移 (ODO4451-01)	6.7	甲状腺 NAT INVITROGEN A302153	23.2
87473 肺 (ODO4451-02)	4.3	子宮癌 GENPAK 064011	29.1
87474 腎臓癌 (ODO4622-01)	7.5	γ-H2AX DNA コントロール	0.3
87475 腎臓 NAT (ODO4622-03)	1.7	87492 卵巣癌 (ODO4768-07)	78.5

表 4 の結果は、MEM 5 が、隣接する非癌性組織と比較して、特定の腫瘍サンプルにおいて優先的に発現されることを示す。これらの腫瘍としては、肝臓転移、腎臓腫瘍、前立腺癌、および卵巣癌が挙げられる。さらに、このパネル中の調和した正常組織を有さないさらなる腫瘍組織において高度に発現される。

【0322】

従って、表 3 および表 4 の結果は、MEM 5 が特定の癌型のための診断プローブとして役立ち得ることを示唆する。

【0323】

(実施例 2：種々の細胞および組織における MEM 7 の発現のリアルタイム定量的 (RT Q) PCR 評価)

MEM 7 (国際識別番号 AC018653_A) 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的 PCR (TAQMAN (登録商標)) によって正常サンプルおよび腫瘍サンプルにおいて評価した。本実施例に含まれる表において、以下の略語を使用した：

ca. = 癌 (carcinoma)

10

20

30

40

50

* = 転移から定着した (e s t a b l i s h e d f r o m m e t a s t a s i s)
 m e t = 転移 (m e t a s t a s i s)
 s c e l l v a r = 小細胞変異体 (S m a l l C e l l V a r i a n t)
 n o n - s = n o n - s m = 非小 (n o n - S m a l l)
 s q u a m = 鱗状 (s q u a m o u s)
 p l . e f f = p l . e f f u s i o n = 胸水 (p l e u r a l e f f u s i o n)
 g l i o = 神経膠腫 (g l i o m a)
 a s t r o = 星状細胞腫 (a s t r o c y t o m a)
 n e u r o = 神経芽細胞腫 (n e u r o b l a s t o m a)。

【0324】

96のRNAサンプルを、 β アクチンおよびGAPDHのような内部基準について正規化した。RNA (~ 50 ngの合計または ~ 1 ngのポリA⁺)を、TAQMAN (登録商標) Reverse Triascription Reagents Kit (PE Biosystems; Foster City, CA; カタログ番号N808-0234)を使用し、そして製造者のプロトコルに従ってランダムヘキサマーを使用してcDNAに転換した。反応を20 μ lで行い、そして30分間48°Cでインキュベートした。次いで、cDNA (5 μ l)を、TAQMAN (登録商標) 反応のために、 β アクチンおよびGAPDH TAQMAN (登録商標) Assay Reagents (PE Biosystems; それぞれ、カタログ番号431088Eおよび4310884E) およびTAQMAN (登録商標) Universal PCR Master Mix (PE Biosystems; カタログ番号4304447) のような内部基準を使用して、製造者のプロトコルに従って、分離プレートに移した。25 μ lの総反応量で、以下のパラメーターを使用して反応を行った: 2分間50°C; 10分間95°C; 15秒間95°C; および1分間60°C (40サイクル)。結果を、ログスケールを使用してCT値 (所定のサンプルが、蛍光の閾値レベルで交差するサイクル) として記録した。ここで、所定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、 $2^{\Delta CT}$ として示された。次いで、このRNAの差の逆数を取り、そして100を掛けることによって相対発現パーセントを得た。 β アクチンおよびGAPDHから得られた平均のCT値を、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を、それらの β アクチン/GAPDH平均CT値に従って、このサンプルと比較して希釈した。

【0325】

正規化RNA (5 μ l)を、cDNAに転換し、そして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して、製造者の指示に従って、TAQMAN (登録商標) を通じて分析した。プローブおよびプライマーを、入力として標的配列を使用するPerkin Elmer Biosystem's Primer Express Softwareパッケージ (Apple Computer's Macintosh PCのためのVersion 1) または類似のアルゴリズムに従って、各アッセイについて設計した。デフォルトの設定を、反応条件について使用し、そして以下のパラメーターをプライマーの選択の前に設定した: プライマー濃度 = 250 nM; プライマー溶解温度 (T_m) 範囲 = 58°C ~ 60°C; プライマー最適 T_m = 59°C; 最大プライマー差異 = 2°C; プローブは、5'末端Gを有さない; プローブ T_m は、プローブ T_m よりも10°Cより高くなければならない; そしてアンプリコンのサイズは、75 bp ~ 100 bpでなければならない。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、結合していない色素を除去するためにHPLCによって二回精製し、そしてそれぞれプローブの5'末端および3'末端に対するレポーターおよびクエンチャー色素の結合を確認するために質量分析によって評価した。その最終濃度は、以下であった: 順方向および逆方向プライマー = それぞれ900 nM; およびプローブ = 200 nM。

【0326】

以下のPCR条件を用いた。各組織および各細胞株由来の正規化されたRNAを、96ウェルの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（標的クローン特異的プローブおよび標的プローブで多重化された別の遺伝子特異的プローブ）を含むPCR反応混合物をPE Biosystems 7700のための1X TaqManTM PCR Master MIXを使用して調製した。この混合物は、以下を含んだ：5mM MgCl₂；dNTP（dA、dG、dC、およびdUを1：1：1：2の比で）；0.25U/ml AmpliTaq GoldTM（PE Biosystems）；0.4U/μl RNaseインヒビター；および0.25U/μl逆転写酵素。逆転写を48℃で30分間行い、続いて、以下のような増幅／PCRサイクルを行った：95℃で10分間；次いで95℃で15秒間および60℃で1分間の40サイクル。

【0327】

2つのサンプルパネルを本実施例において使用した。パネル1は、そのウェルがヒト悪性組織（すなわち、腫瘍）から樹立された種々のヒト細胞株から単離されたRNA／cDNAを含む、96ウェルプレート（通常、2つのコントロールウェル、94の試験サンプル）である。これらの細胞株は、それらの腫瘍形成能、転移可能性、薬物耐性、侵襲性可能性および他の癌関連特性に関して、学術研究機関および商業部門の両方の研究者によって広く特徴付けられてきた。これらは、抗癌剤および有望な治療ストラテジーの臨床前評価のための適切な道具として役立つ。これらの種々のヒト癌細胞株由来のRNAが、国立癌研究所（USA）の発症治療部門（DTB）から単離および獲得された。それらの生物学的行動、遺伝子発現、および種々の細胞障害性薬剤に対する耐性に関する基本的情報は、DTB（<http://dtp.nci.nih.gov/>）によって提供される。

【0328】

さらに、RNA／cDNAを、死亡した高齢者または急死した犠牲者（事故など）に対して行なわれたヒト剖検由来の種々のヒト組織から獲得した。これらの組織が疾患のないことを確認した。ならびにClontech, Inc.、Research Genetics、およびInvitrogenのような種々の高品質の販売元から購入した。

【0329】

すべてのサンプルからのRNA完全性は、ガイドとしての28sおよび18sリボソームRNA染色強度比率（2：1～2.5：1 28s：18s）および変性産物の指標となる低分子量RNAの非存在を確認するアガロースゲル電気泳動の視覚的評価によって、品質について制御される。

【0330】

パネル2は、国立癌研究所の共同ヒト組織ネットワーク（CHTN）または国立疾病研究所（NDR I）と密接に協力した外科医の作業によって獲得されたヒト組織から単離されたRNA／cDNAを含む96ウェルプレート（通常、2つのコントロールウェル、94の試験サンプル）である。獲得された組織は、ヒト悪性腫瘍に由来し、そして、この場合に多数の悪性組織が「調和したマージン（matched margins）」を有することを示した。この腫瘍組織および「調和したマージン」は、2人の独立した病理学者（外科的病理学者および再びNDR IまたはCHTNの病理学者）によって評価された。この分析は、腫瘍分化グレードの全体の組織病理学的評価を提供する。さらに、大部分のサンプルは、患者の臨床学的段階に関する情報を提供する本来の外科的病理学報告を含む。これらの調和したマージンは、手術区域の周囲の組織（すなわち、すぐ近接）から採取される（正常な隣接組織について、「NAT」と命名される）。さらに、RNAまたはcDNAを、死亡した高齢者または急死した犠牲者（事故など）に対して行なわれたヒト剖検由来の種々のヒト組織から獲得した。これらの組織が疾患のないことを確認し、そしてClontech, Research Genetics、およびInvitrogenのような種々の高品質の販売元から購入した。

【0331】

再び、全てのサンプルからのRNA完全性を、ガイドとして28Sおよび18SrRNA染色強度比率（2：1～2.5：1 28S：18Sの比）を使用し、そして変性産物の指標となる低分子量RNAの非存在を確認することによって、アガロースゲル電気泳動の視覚的評価によって、品質について制御した。単一のエキソンの長さによって増幅するように設計されたプローブおよびプライマーセットを使用して、逆転写酵素の非存在下で、反応物の泳動によってゲノムDNA混入について、サンプルを品質制御した。

【0332】

パネル1を利用する以下のMEM7配列（国際識別番号AC018653_A）のRTQ PCRを、表5において指定されるプライマー-プローブセットAg1387を使用して、表6に示した。

10

【0333】

【表5】

表5

プライマー	配列	長さ	開始位置	配列番号
順方向	5'-CTGAAACCTTCATCCACACAAT-3'	22	18	20
逆方向	5'-GCAGGTAGTCCTCCATGTTCTT-3'	22	80	22
プローブ	TET-5'-TCACTGGCTACTACCGCTTTGTCTCG-3'-TAMRA	26	51	21

20

【0334】

【表6】

表 6

細胞供給源	相対発現 %, 1.2tm1615t	細胞供給源	相対発現 %, 1.2tm1615t
内皮細胞	0.1	腎臓 ca. 786-O	0.2
内皮細胞 (処置)	0.6	腎臓 ca. A498	0.7
脾臓	0.0	腎臓 ca. RXF 393	0.3
脾臓 ca. CAPAN 2	0.1	腎臓 ca. ACHN	0.7
副腎 (新ロット*)	0.4	腎臓 ca. UO-31	0.5
甲状腺	0.0	腎臓 ca. TK-10	0.3
唾液腺	0.7	肝臓	12.7
下垂体	0.0	肝臓 (胎児)	1.4
肝臓 (胎児)	0.0	肝臓 ca. (肝母細胞) HepG2	1.7
肝臓 (全株)	0.0	肺	0.1
肝臓 (扁桃体)	0.0	肺 (胎児)	0.3
肝臓 (小腸)	0.0	肺 ca. (small cell) LX-1	1.1
肝臓 (海馬)	0.1	肺 ca. (small cell) NCI-H69	0.7
肝臓 (視床)	0.1	肺 ca. (s. cell var.) SHP-77	0.0
大脳皮質	0.2	肺 ca. (large cell) NCI-H460	1.7
脊髄	0.0	肺 ca. (non-sm. cell) A849	0.8
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	0.1	肺 ca. (non-s. cell) NCI-H23	1.3
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.1	肺 ca. (non-s. cell) HOP-62	0.6
CNS ca. (astro) SW1783	0.1	肺 ca. (non-s. d) NCI-H522	0.9
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	0.1	肺 ca. (squamous) SW 900	0.5
CNS ca. (astro) SF-839	0.3	肺 ca. (squamous) NCI-H586	0.3
CNS ca. (astro) SNB-75	0.0	乳腺	0.3
CNS ca. (glio) SNB-19	0.1	乳房 ca.* (pl. effusion) MCF-7	0.0
CNS ca. (glio) U251	0.0	乳房 ca.* (pl. eff) MDA-MB-231	0.0
CNS ca. (glio) SF-295	0.3	乳房 ca.* (pl. effusion) T47D	0.1
心臓	0.3	乳房 ca. BT-549	0.0
骨格筋 (新ロット*)	0.0	乳房 ca. MDA-N	0.1
骨髄	0.2	卵巣	0.7
脳月系	0.4	卵巣 ca. OVCAR-3	0.2
月系	1.5	卵巣 ca. OVCAR-4	0.2
リンパ節	1.3	卵巣 ca. OVCAR-5	1.3
結腸直腸	0.0	卵巣 ca. OVCAR-8	0.3
胃	0.8	卵巣 ca. IGROV-1	0.3
小腸	1.8	卵巣 ca.* (腹水) SK-OV-3	0.4
結腸 ca. SW480	0.1	子宮	1.0
結腸 ca.* (SW480 met) SW620	0.3	胎盤	0.0
結腸 ca. HT29	0.3	前立腺	0.9
結腸 ca. HCT-116	0.3	前立腺 ca.* (骨. met) PC-3	0.4
結腸 ca. CaCo-2	0.5	精巣	0.0
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3566)	0.2	黒色腫 Hs588(A).T	0.1
結腸 ca. HCC-2998	1.5	黒色腫 * (met) Hs588(B).T	0.1
胃 ca.* (新腫 met) NCI-N87	0.7	黒色腫 UACC-62	0.1
膀胱	2.5	黒色腫 M14	0.0
気管	0.1	黒色腫 LOX IMVI	0.0
腎臓	100.0	黒色腫 * (met) SK-MEL-5	0.0
腎臓 (胎児)	0.3	腎臓	1.7

さらに、配列MEM7の発現をまた、パネル2の同じプライマー-プローブセットAg1387を使用して評価した。結果を表7に示す。

【0335】

【表7】

表 7.

組織供体源	相対的 発現 % 2tm515f	組織供体源	相対的 発現 % 2tm515f
83786 腎臓, Ca, Nuclear grade 2 (OD04338)	9.9	87492 卵巣癌 (OD04768-07)	17.7
83219 CC Well to Mod Diff (OD03866)	3.7	87493 卵巣, NAT (OD04768-08)	9.0
83220 CC NAT (OD03866)	3.7	腫瘍癌 INVITROGEN A302173	7.9
83221 CC Gr.2 重腸S状部 (OD03868)	3.4	腫瘍癌 Research Genetics RNA 1023	4.0
83222 CC NAT (OD03866)	1.3	乳癌 Clontech 8100266	6.1
83235 CC Mod Diff (OD03920)	10.6	乳癌 INVITROGEN A209073	6.6
83236 CC NAT (OD03920)	5.0	乳癌 Res. Gen. 1024	9.9
83237 CC Gr.2 結腸上部 (OD03921)	4.6	乳癌 NAT Clontech 8100265	3.8
83238 CC NAT (OD03921)	2.3	乳癌 NAT INVITROGEN A2090734	8.0
83239 筋肉心 肝臓初 (OD04286)	2.8	GENPAK 乳癌 084008	12.8
83240 Muscle NAT (OD04286)	6.4	乳癌 Clontech 9060395	5.8
83241 特発性肝臓胆管のCC (OD04309)	7.1	乳癌 Clontech 9060397	6.3
83242 肝臓 NAT (OD04309)	80.1	乳癌 GENPAK 084005	12.5
83255 肝臓の胆管Hollands (OD04310)	1.7	腎臓癌 Clontech 8120607	8.3
83256 肝臓 NAT (OD04310)	51.4	腎臓癌 Clontech 8120613	1.0
83787 腎臓 NAT (OD04338)	11.5	腎臓癌 Clontech 9010320	3.7
83788 腎臓 Ca Nuclear grade 1/2 (OD04339)	26.4	腎臓 NAT Clontech 8120608	4.4
83789 腎臓 NAT (OD04339)	10.7	腎臓 NAT Clontech 8120614	2.9
83790 腎臓 Ca, Clear cell type (OD04340)	12.0	腎臓 NAT Clontech 9010321	3.1
83791 腎臓 NAT (OD04340)	8.2	肝臓癌 GENPAK 084003	23.5
83792 腎臓 Ca, Nuclear grade 3 (OD04348)	6.7	肝臓癌 Research Genetics RNA 1025	92.7
83793 腎臓 NAT (OD04348)	12.9	肝臓癌 Research Genetics RNA 1026	16.8
84138 肺腺癌 (OD03126)	4.7	NAT 肝臓 Clontech 9060399	7.1
84137 肺 NAT (OD03126)	9.7	NAT 肝臓 Clontech 9060394	7.2
84138 肺 NAT (OD04321)	4.7	NAT 肝臓 Clontech 9060396	3.4
84139 肺の癌細胞の集団 (OD04321)	5.1	正常肺臓 GENPAK 081001	13.0
84140 肺臓 (OD04410)	7.0	正常乳癌 GENPAK 081019	8.1
84141 肺臓 NAT (OD04410)	11.0	正常肺臓 GENPAK 081003	5.2
84871 肺臓 (OD04404)	4.4	正常腎臓 GENPAK 081008	4.8
84872 肺 NAT (OD04404)	4.3	正常肝臓 GENPAK 081009	100.0
84875 肺臓 (OD04565)	9.3	正常肺臓 GENPAK 081010	6.7
84877 乳癌 (OD04568)	7.8	正常卵巣 Res. Gen.	7.0
85950 肺臓 (OD04237-01)	6.2	正常肺臓 A+ 8546-1	4.8
85970 肺 NAT (OD04237-02)	5.1	正常肺臓 GENPAK 081017	6.4
85973 腎臓癌 (OD04450-01)	13.4	正常腎臓 Clontech A+ 8570-1**	8.1
85974 腎臓 NAT (OD04450-03)	8.3	正常子宮 GENPAK 081018	3.0
85975 乳癌 (OD04590-01)	6.3	卵巣癌 GENPAK 084008	11.7
85976 乳癌 Metas (OD04590-03)	7.1	対症肝臓癌組織 RNA 6004-T	54.0
87070 乳癌転移 (OD04655-05)	9.4	対症肝臓癌組織 RNA 6005-T	18.4
87071 腫瘍癌 (OD04718-01)	5.3	対症肝臓癌組織 6004-N	26.1
87072 近接正常肝臓 (OD04718-03)	4.8	対症肝臓癌組織 RNA 6005-N	55.1
87073 腎臓癌 (OD04720-01)	13.1	腎臓癌 Cancer GENPAK 084010	3.4
87074 腎臓 NAT (OD04720-02)	10.4	腎臓癌 Cancer INVITROGEN A302152	10.7
87472 肝臓の結腸転移 (OD04451-01)	9.5	腎臓癌 NAT INVITROGEN A302153	7.7
87473 肝 NAT (OD04451-02)	5.6	子宮癌 GENPAK 084011	10.8
87474 腎臓癌 (OD04622-01)	27.4	ゲム DNA コントロール	0.6
87475 腎臓 NAT (OD04622-03)	7.1		

MEM7についての結果は、正常な腎臓および肺組織、および全てではないが特定の腫瘍について、これらの器官における特定の腫瘍に隣接する正常な組織において、主に発現されることを示す。これらの結果は、MEM7が、癌性組織から正常な組織を識別するために使用され得ることを示唆する。

【0336】

(他の実施形態)

本発明を、その詳細な説明と共に記載してきたが、前述の説明は、例示であり、かつ添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定しないということが意図される。他の局面、利点および改変は、上述の特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の7回膜貫通受容体様タンパク質のヌクレオチド配列〔配列番号1〕を示す。開始コドンおよび終止コドンは、ボールドフォントで示される。

【図2】

図2は、図1に示されるコード配列によってコードされるアミノ酸配列〔配列番号2〕を示す。

10

20

30

40

50

【図 3】

図 3 は、核酸配列 [配列番号 1] を導く B L A S T N 識別サーチを示す。

【図 4】

図 4 は、アミノ酸配列 [配列番号 2] についての B L A S T X 識別サーチを示す。

【図 5】

図 5 は、アミノ酸配列 [配列番号 2] についての B L A S T P 識別サーチを示す。

【図 6】

図 6 は、アミノ酸配列 [配列番号 2] の C l u s t a l W アライメントを示す。

【図 7】

図 7 は、本発明のグルタミン酸受容体改変体 (2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 1) をコードする配列 [配列番号 3] を含む、ヌクレオチド配列を示す。開始コドンおよび終止コドンは、ボールドフォントで示される。 10

【図 8】

図 8 は、図 7 に示される 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 1 のコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 4] を示す。

【図 9】

図 9 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 1 の核酸配列 [配列番号 3] を導く B L A S T N 識別サーチを示す。

【図 10】

図 10 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 1 のアミノ酸配列 [配列番号 4] についての B L A S T X 識別サーチを示す。 20

【図 11】

図 11 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 1 の C l u s t a l W アライメントを示す。

【図 12】

図 12 は、本発明のグルタミン酸受容体改変体 (2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 2) をコードする配列 [配列番号 5] を含む、ヌクレオチド配列を示す。

【図 13】

図 13 は、図 12 の 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 2 のコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 6] を示す。

【図 14】

図 14 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 2 の核酸配列 [配列番号 5] を導く B L A S T N 識別サーチを示す。 30

【図 15】

図 15 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 2 のアミノ酸配列 [配列番号 6] についての B L A S T X 識別サーチを示す。

【図 16】

図 16 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 2 の C l u s t a l W アライメントを示す。

【図 17】

図 17 は、本発明のグルタミン酸受容体改変体 (2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 3) をコードする配列 [配列番号 7] を含む、ヌクレオチド配列を示す。 40

【図 18】

図 18 は、図 17 に示される 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 3 のコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 8] を示す。

【図 19】

図 19 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 3 の核酸配列 [配列番号 7] を導く B L A S T N 識別サーチを示す。

【図 20】

図 20 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 3 のアミノ酸配列 [配列番号 8] についての B L A S T X 識別サーチを示す。

【図 21】

図 2 1 は、改変体 2 1 6 5 9 2 5 9 E X T 3 の C l u s t a l W アライメントを示す。

【図 2 2】

図 2 2 は、本発明のグルタミン酸受容体の 3 つのスプライス改変体の C l u s t a l W アライメントを示す。

【図 2 3】

図 2 3 は、本発明のカリウムチャンネルタンパク質のヌクレオチド配列 [配列番号 9] を示す。開始コドンの 5 ' 側の推定の翻訳されない領域は、下線で示されるが、開始コドンおよび終止コドンがボールドフォントで示される。

【図 2 4】

図 2 4 は、図 2 3 に示されるコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 1 0] を示す。 10

【図 2 5】

図 2 5 は、本発明のタンパク質 [配列番号 1 0] についての B L A S T X 識別サーチを示す。

【図 2 6】

図 2 6 は、本発明のフォスファターゼ 1 様タンパク質をコードする配列 [配列番号 1 1] を含むヌクレオチド配列を示す。開始コドンの 5 ' 側および終止コドンの 3 ' 側の推定の翻訳されない領域は、下線で示され、そして開始コドンおよび終止コドンがボールドフォントで示される。

【図 2 7】

図 2 7 は、図 2 6 で示されるコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 1 2] を示す。 20

【図 2 8】

図 2 8 は、本発明のフォスファターゼ 1 様タンパク質をコードする核酸配列についての B L A S T N 識別サーチを示す。

【図 2 9】

図 2 9 は、本発明のフォスファターゼ 1 様タンパク質についての B L A S T X 識別サーチを示す。

【図 3 0】

図 3 0 は、本発明のフォスファターゼ 1 様タンパク質の C l u s t a l W アライメントを示す。 30

【図 3 1】

図 3 1 は、本発明の、レチノール結合タンパク質に似たタンパク質をコードする配列を含む、ヌクレオチド配列 [配列番号 1 3] を示す。開始コドンの 5 ' 側および終止コドンの 3 ' 側の推定の翻訳されない領域は、下線で示され、そして開始コドンおよび終止コドンがボールドフォントで示される。

【図 3 2】

図 3 2 は、図 3 1 で示されるコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 1 4] を示す。

【図 3 3】

図 3 3 は、図 3 2 に示される本発明のレチノール結合様タンパク質についての B L A S T X 識別サーチを示す。 40

【図 3 4】

図 3 4 は、本発明の、レチノール結合タンパク質に似たタンパク質をコードする配列を含む、ヌクレオチド配列 [配列番号 1 5] を示す。

【図 3 5】

図 3 5 は、図 3 4 で示されるコード配列によってコードされるアミノ酸配列 [配列番号 1 6] を示す。

【図 3 6】

図 3 6 は、図 3 5 で示される本発明のレチノール結合様タンパク質についての B L A S T 50

P 識別サーチを示す。

【図 37】

図 37 は、図 35 で示される本発明のレチノール結合様タンパク質の Clustal W アライメントを示す。

【図 30】

このアラインメントに基づき、黒で囲んだアミノ酸残基は保存された配列の領域（すなわち、構造的特性または機能的特性を保存するために必要とされ得る領域）を示す。灰色を付したアミノ酸残基は、タンパク質の構造または機能を変化させることなく、互換する立体構造的特性および/または化学的特性を有する残基に置き換え得る（例えば、L から V、I、または M）；強調表示していないアミノ酸残基は、構造または機能を変化させることなく、ずっと広範な程度で潜在的に置き換え得る。

```

Q5739_FPI_RAT      .....EYGVEMSLR..REITFFSPKLNQPLKISG
AC31445_A          .....MGRDYVHCAELA..CDAIETKPSPLPSIS
QM541_FPI_MOUSE   .....ANCLHNSPLKFLKNGKRFVNLPLCHES-
AADD311_FPIR2_HUMAN MIQVLDPRLTSSVMPVDANAKLHNSPLKFLKNGKRFVNLPLCHES-

Q5739_FPI_RAT      .....GORMVPIYEKKVKKKAFACNQIAETKVFIFDPP..LSEITLQNI
AC31445_A          .....GORMVPIYEKKVKKKAFACNQIAETKVFIFDPP..LSEITLQNI
QM541_FPI_MOUSE   .....GAKQSFVSPHNQAQKRVFALSKHETAHVVFSLPSE..QEDHLLKGS
AADD311_FPIR2_HUMAN .....GAKQSFVSPHNQAQKRVFALSKHETAHVVFSLPSE..QEDHLLKGS

Q5739_FPI_RAT      VSTTIAESESFLDSDPQADVTSKRRSTQVCEHQVSEHAAEVNCHAFEVV
AC31445_A          VSTTIAESESFLDSDPQADVTSKRRSTQVCEHQVSEHAAEVNCHAFEVV
QM541_FPI_MOUSE   VSTTIAESESFLDSDPQADVTSKRRSTQVCEHQVSEHAAEVNCHAFEVV
AADD311_FPIR2_HUMAN VAKKHHEKKNLQDSFSDPTDVLSESHYQNFCEHQVSEHAAEVNCHAFEVV

Q5739_FPI_RAT      .....RRTFDIVKSEIIFRQKQDTAGGDSDFSSDSEKSEHSEHAAEVNCHAFEVV
AC31445_A          .....RRTFDIVKSEIIFRQKQDTAGGDSDFSSDSEKSEHSEHAAEVNCHAFEVV
QM541_FPI_MOUSE   .....RRTFDIVKSEIIFRQKQDTAGGDSDFSSDSEKSEHSEHAAEVNCHAFEVV
AADD311_FPIR2_HUMAN .....RRTFDIVKSEIIFRQKQDTAGGDSDFSSDSEKSEHSEHAAEVNCHAFEVV

Q5739_FPI_RAT      SMDGKSKKAYNITRAEL--STQMLQVYN.....DQFCVCEGSEFSCSTFFP
AC31445_A          TMDGKSKKAYNITRAEL--STQMLQVYN.....DQFCVCEGSEFSCSTFFP
QM541_FPI_MOUSE   IMDGKSKKAYNITRAEL--STQMLQVYN.....DQFCVCEGSEFSCSTFFP
AADD311_FPIR2_HUMAN VMDGKSKKAYNITRAEL--STQMLQVYN.....DQFCVCEGSEFSCSTFFP

Q5739_FPI_RAT      .....EVLGSKKQPV
AC31445_A          .....EVLGSKKQPV
QM541_FPI_MOUSE   .....EVLGSKKQPV
AADD311_FPIR2_HUMAN .....EVLGSKKQPV

```

【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
21 June 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/44473 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, 15/52, C07K 14/705, C12N 9/16, C07K 16/28, 16/40, G01N 33/68, C12Q 1/68, A61K 38/17, 38/43, 48/00, 39/395, 31/7088

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

(21) International Application Number: PCT/US00/33909

(22) International Filing Date: 14 December 2000 (14.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:		
60/170,564	14 December 1999 (14.12.1999)	US
60/173,165	27 December 1999 (27.12.1999)	US
60/173,362	27 December 1999 (27.12.1999)	US
60/173,544	29 December 1999 (29.12.1999)	US
Not furnished	4 January 2000 (04.01.2000)	US
60/223,929	9 August 2000 (09.08.2000)	US

US	60/170,564 (CIP)	
Filed on	14 December 1999	(14.12.1999)
US	60/173,165 (CIP)	
Filed on	27 December 1999	(27.12.1999)
US	60/173,362 (CIP)	
Filed on	27 December 1999	(27.12.1999)
US	60/173,544 (CIP)	
Filed on	29 December 1999	(29.12.1999)
US	60/173,544 (CIP)	
Filed on	4 January 2000	(04.01.2000)
US	60/223,929 (CIP)	
Filed on	9 August 2000	(09.08.2000)
US	60/223,929 (CIP)	
Filed on	13 December 2000	(13.12.2000)

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

[Continued on next page]

(54) Title: POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

[illegible]

(57) Abstract: The present invention provides novel isolated MEMX polynucleotides and polypeptides encoded by the MEMX polynucleotides. Also provided are the antibodies that immunospecifically bind to a MEMX polypeptide or any derivative, variant, mutant or fragment of the MEMX polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the MEMX polypeptide, polynucleotide and antibody are utilized in the detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as to other uses.

WO 01/44473 A

WO 01/44473 A2



(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SPADERNA, Steven, K. [US/US]; 261 Deerfield Drive, Berlin, CN 06037 (US). QUINN, Kerry, E. [US/US]; 51 Greenfield Drive, Torrington, CT 06790 (US). SHIMKETS, Richard, A. [US/US]; 191 Leete Street, West Haven, CT 06516 (US). MURALIDHARA, Padigara [IN/US]; Apartment 6E, 1579 Rhineland Avenue, Bronx, NY 10561 (US). SPYTEK, Kimberley, A. [US/US]; 28 Court Street, #1, New Haven, CT 06511 (US).

(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glosky 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, TR), OAPI patent (BF, BI, 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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME**FIELD 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.

BACKGROUND OF THE INVENTION**Seven-Pass Transmembrane Receptor**

Seven-pass transmembrane proteins are transmembranal proteins with seven α -helices, comprising mostly hydrophobic residues, which serve to facilitate membrane anchoring (*see, e.g.,* Müller, 2000. *Curr. Med. Chem.* 7: 861-888) and are believed to accommodate the binding site for low-molecular weight ligands.

The most well-characterized of the seven-pass transmembrane receptor proteins are the guanine nucleotide-binding signal-transducing protein (G-protein)-coupled receptors (GPCR) which transduce chemical signals through the cytoplasmic membrane by the activation of intracellular G-proteins. *See, e.g.,* Watson and Arkinstall, *THE G-PROTEIN LINKED RECEPTORS*, Academic Press, San Diego, CA, 1994, pp. 1-294. In addition, GPCRs constitute the most prominent family of validated drug targets within biomedical research, as approximately 60% of all approved drugs elicit their therapeutic effects by selectively interacting members of this family of proteins and serve as key molecular targets for therapeutic intervention in a host of disease states.

GPCRs transduce extracellular signals that modulate the activity of a wide variety of biological processes, such as neurotransmission, chemoattraction, cardiac function, olfaction, and vision. Hundreds of GPCRs signal through one or more of these G proteins in response to a large variety of stimuli including photons, neurotransmitters, and hormones of variable molecular structure. GPCRs function as a diverse family of regulatory GTPases which mediate their intracellular actions through the activation of guanine nucleotide-binding signal-transducing proteins (G proteins), that, in the GTP-bound state, bind and activate downstream membrane-localized effectors. The mechanisms by which these ligands provoke activation of the receptor/G-protein system are highly complex and multifactorial. Prominent members of GPCRs

WO 01/44473

PCT/US00/33909

include, *e.g.*, angiotensin II, CCK/gastrin, interleukin 8, endothelin, and the like. *See, e.g.*, van Neuren, 1999. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 9:341-353.

The GPCR superfamily is evolutionarily conserved and structurally characterized by its possessing putative seven-transmembrane (TM) domains with an extracellular amino-terminus and a cytoplasmic carboxyl-terminus. GPCRs are composed of several independent folding units, with the transmembrane domains arranged in a barrel-like structure with a tightly packed core. The universal adoption of the conserved seven-TM structure by GPCRs, which consequently confers three intracellular and three extracellular loops along with a TM core, generally is speculated as the minimum necessity to achieve their structural stability and functional diversity. None of nearly 2,000 GPCRs identified in prokaryotes and eukaryotes to date are known to contain fewer than seven TM domains.

In a recent study, alignment of the primary sequences demonstrated a high degree of homology within the GPCR transmembrane regions. Three-dimensional (3D) models of 39 GPCRs were generated using the refined model of bacteriorhodopsin as a template. Five cationic neurotransmitter receptors (*i.e.*, serotonergic 5-HT₂, dopaminergic D₂, muscarinic m₂, adrenergic alpha 2, and beta 2 receptors) were taken as prototypes and studied in detail. The 3D models of the cationic neurotransmitter receptors, together with their primary structure comparison, indicate that the agonist binding site is located near the extracellular face of the receptor and involves residues of the membrane-spanning helices 3, 4, 5, 6, and 7. The binding site consists of a negatively-charged Asp located at the middle of transmembrane helix 3 and a hydrophobic pocket containing conserved aromatic residues on helices 4, 5, 6, and 7. In addition, all the GPCRs were shown to possess invariant hinge residues, which are thought to be responsible for a conformational change during agonist binding and therefore influence dissociation and association of G-proteins to the receptors. Modulation of the coupling of the G-protein is due to conformation changes within this region via hydrophobic interactions and hydrogen bonding. The information of an extracellularly occurring receptor-ligand recognition event is transferred through conformational rearrangements within the transmembrane portion of GPCR to the intracellular compartment. Thus, GPCRs establish a functional and unidirectional link between the exterior of a cell and its cytoplasm.

Generally, GPCR activation is followed rapidly by a loss of responsiveness, termed desensitization, which is then followed by a period of recovery or resensitization. These changes

WO 01/44473

PCT/US00/33909

in signaling potential are tightly regulated, primarily via mechanisms that involve GPCR phosphorylation and trafficking to distinct locations within the cell.

Glutamate and Aspartate Receptors

Glutamate and Aspartate receptors abound in the Central Nervous System (CNS), eliciting responses both by ionotropic and metabotropic responses. Included within the metabotropic response class are glutamate receptors, which are generally comprised of seven, single-chain transmembrane-spanning proteins. Many cDNAs encoding metabotropic receptors, as well as ionotropic receptors for N-methyl-D-aspartate, have been identified in recent years. The diversity of receptor types has also been found to markedly increase as a result of alternative splicing processes and even by single-base editing of mRNAs. *See, e.g.,* Gilman and Goodman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Ninth Ed., Hardman, JG, *et al.* (eds.) McGraw-Hill, New York, 1996, pages 278-282.

Recently there has been interest in investigating the role of glutamate receptors in the pathophysiology of schizophrenia. Indeed, the hyperdopaminergic theory of schizophrenia can explain only the positive symptoms of schizophrenia, whereas the glutamate hypothesis may provide a more comprehensive view of the illness. Noorbala, *et al.* (*Piracetam in the treatment of schizophrenia: implications for the glutamate hypothesis of schizophrenia*. PMID: 10583700) undertook a trial to investigate whether the combination of haloperidol with piracetam, a nootropic agent that modulates the glutamate receptor positively, was more effective than haloperidol alone in treating the disease. They examined thirty patients who met the DSM IV criteria for schizophrenia. Patients were allocated in a random fashion, 14 received both haloperidol (30 mg/day) and piracetam (3200 mg/day), and 16 patients received only haloperidol (30 mg/day) plus placebo. It was found that both protocols significantly decreased the score of the positive symptoms, the negative symptoms, the general psychopathological symptoms and the total score of PANSS scale over the trial period. Nevertheless, these workers also demonstrated that the combination of haloperidol and piracetam showed a significant superiority over haloperidol alone in the treatment of schizophrenic patients. They concluded that piracetam, a member of the nootropic class of drugs and a positive modulator of the glutamate receptor, may be of therapeutic benefit in treating schizophrenic patients in combination with typical neuroleptic agents.

Excessive activity of excitatory amino acids released after head trauma has also been demonstrated to contribute to progressive injury in animal models and human studies. *See, e.g.,*

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Morris, *et al.*, 1999. *J Neurosurg* 91(5): 737-743. Several pharmacological agents that act as antagonists to the glutamate receptor have shown promise in limiting this progression. The efficacy of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist Selfotel (CGS 19755) was evaluated in two parallel studies of severely head injured patients, defined as patients with post resuscitation Glasgow Coma Scale scores of 4 to 8. The Selfotel trial was terminated prior to completion, however, because of severe adverse effects on some of the subjects. The results of this trial demonstrate the need for a better understanding of the properties of the glutamate receptors in the brain, and of the need for discovering more effective agonists and antagonists of this receptor.

Potassium Channel

The potassium channel mediates the voltage-dependent potassium ion permeability of excitable membranes. Depending upon whether the protein assumes an opened or closed conformation in response to the voltage difference across the membrane, the protein forms a potassium-selective channel through which potassium ions may pass in accordance with their electrochemical gradient.

The potassium channel has been shown to be an integral membrane protein. The segment s4 is probably the voltage-sensor and is characterized by a series of positively charged amino acids at every third position. Additionally, the tail may be important in modulation of channel activity and/or targeting of the channel to specific sub-cellular compartments. This channel protein belongs to the delayed rectifier class, and to the Shaw potassium channel subfamily.

IKr (potassium ion channel, rapid response) blockade is ineffective in preventing ventricular fibrillation elicited by the interaction between acute myocardial ischemia and elevated sympathetic activity. This depends, in-part, upon the fact that adrenergic activation offsets more than 50% of the action potential prolonging effect of IKr blockade, and thus impairs its primary mechanism of action. The antifibrillatory effect of ersentilide (CK-3579), a novel antiarrhythmic agent which combines blockade of the rapid component of the delayed rectifier potassium channel (IKr) with relatively weak beta-adrenergic blockade, has been examined in a conscious canine model of lethal arrhythmias. *See, Adamson, et al.*, 1998. *Cardiovascular Res.* 40(1): 56-63). Ersentilide was tested in 19 dogs with a healed myocardial infarction (MI) undergoing two minutes of circumflex artery occlusion (CAO) during sub-maximal treadmill exercise. Epicardial monophasic action potential duration was measured before and after ersentilide in 8 anesthetized open chest dogs at baseline and during stimulation of the left stellate

WO 01/44473

PCT/US00/33909

ganglion at constant paced heart rate. In the control tests 13 of the 19 dogs had ventricular fibrillation (VF) during the exercise and ischemia test, 6 did not. During a subsequent exercise test, ersentilide prevented VF in 820% (11 of 13) of the high-risk animals and showed no pro-arrhythmic effects in the 6 dogs without arrhythmias in the initial test. Ersentilide lowered heart rate at all levels of exercise and during acute myocardial ischemia. The anti-fibrillatory effect was maintained in 3 of 4 dogs in which heart rate was kept at control levels by atrial pacing. Ersentilide also was found to prolong left ventricular monophasic action potential duration by 30% (from 179 +/- 6 ms to 233 +/- 5 ms, $p < 0.001$) at a 360 ms cycle length and completely prevented its shortening during sympathetic stimulation. Thus, these authors concluded that the combination of IKr and weak beta-adrenergic blockade, using ersentilide, represents a very effective and safe anti-arrhythmic intervention able to overcome the limitations present in drugs devoid of any anti-adrenergic effect. Such a combination may be very useful in the management of post-myocardial infarction patients at high arrhythmic risk.

Nair and Grant (1997. *Cardiovascular Drugs Ther.* 11(2): 149-167) reviewed antiarrhythmic drugs. The goal of developing an antiarrhythmic agent effective against malignant ventricular arrhythmias while maintaining a low side-effect profile was evaluated as remaining elusive. In this study, the class III drugs, amiodarone and sotalolol, were regarded as the best available agents. However, both drugs possess properties outside the realm of a pure class III effect, and their use is limited by a variety of dose-related side effects. There are several drugs with more selective class III properties currently in development.

The aforementioned review by Nair and Grant (1997) provides an overview of the optimal characteristics of an effective theoretical class III drug and a summary of the properties of a number of class III drugs under active investigation. An ideal class III antiarrhythmic agent for a reentrant arrhythmia should provide use-dependent prolongation of the action potential duration with slow onset and rapid offset kinetics. This drug would prolong the effective refractory period of cardiac tissue selectively at the rapid heart rates achieved during ventricular tachycardia or fibrillation with a delayed onset of action, and a rapid resolution of its effects on resumption of physiologic heart rates. With little effect on the refractory period at normal or slow heart rates, the ability to induce *torsade de pointes* would be lessened. In contrast to these ideal properties, most currently available and investigational agents have a reverse use-dependent effect on the action potential duration, producing more effects on the refractory period at slower heart rates. This property results in part from preferential block of the rapidly activating component of the delayed rectifier potassium channel (IKr), with little or no effect on the slowly

WO 01/44473

PCT/US00/33909

activating component (IKs). The development of a drug with favorable blocking kinetics that selectively blocks IKs may result in lower proarrhythmic events while still maintaining effective antiarrhythmic properties.

Protein Phosphatase I

Protein phosphatase 1 is believed to act as a scaffold for the localization of critical enzymes in glycogen metabolism, including phosphorylase b, glycogen synthase and phosphorylase kinase. The enzyme is expressed predominantly in insulin-sensitive tissues and was found to mediate the hormonal control of glycogen accumulation in intact cells.

Hepatic glycogen synthesis is impaired in insulin-dependent diabetic rats and in adrenalectomized starved rats, and although this is known to be due to defective activation of glycogen synthase by glycogen synthase phosphatase, the underlying molecular mechanism has not been delineated. Glycogen synthase phosphatase comprises the catalytic subunit of protein phosphatase 1 (PP1) complexed with the hepatic glycogen-binding subunit, termed GL. In liver extracts of insulin-dependent diabetic and adrenalectomized starved rats, the level of GL was shown by immunoblotting to be substantially reduced compared with that in control extracts, whereas the level of PP1 catalytic subunit was not affected by these treatments. *See, Doherty, et al., 1998. Biochem. J. 333: 253-257.* Insulin administration to diabetic rats restored the level of GL and prolonged administration raised it above the control levels, whereas re-feeding partially restored the GL level in adrenalectomized starved rats. The regulation of GL protein levels by insulin and starvation/feeding was shown to correlate with changes in the level of the GL mRNA, indicating that the long-term regulation of the hepatic glycogen-associated form of PP1 by insulin, and hence the activity of hepatic glycogen synthase, is predominantly mediated through changes in the level of the GL mRNA. (PMID: 9657963, UI: 98324884).

Retinol-Binding Protein

Retinol-binding protein (RBP) is the specific carrier for retinol (vitamin A) in the blood. Low RBP level in the blood has been found to be associated with low serum retinol level in keratomalacia patients. Familial hypo-RB proteinemia has been found to predispose the proband child to keratomalacia during measles infection, despite good nutrition. *See, e.g., Attard-Montalto, et al.* described a girl with intermittent orange discoloration of her palms, soles, and face and with carotenemia associated with persistently low levels of both vitamin A and serum-specific retinol-binding protein. These authors postulated that the low serum retinol-binding

WO 01/44473

PCT/US00/33909

protein concentration resulted in the slow uptake and release of vitamin A by the liver. The conversion of carotene to vitamin A was consequently inhibited and this resulted in hypercarotenemia. Vitamin A supplements were unable to raise the serum vitamin A concentration and did not relieve the carotenemia.

Seeliger, *et al.*, reported the ocular phenotype in retinol deficiency due to a hereditary defect in retinol-binding protein synthesis. Two affected sisters, aged 17 and 13 years, were compound heterozygous for missense mutations in the RBP4 gene. Each affected sister had had night vision problems since early childhood but was otherwise well. Visual acuities were slightly reduced: 20/40 in the 17 year old and 20/25 in the 13 year old. Both affected sibs had no detectable serum RBP, retinol levels less than 20% of normal, and normal retinyl esters.

RBP gene has been mapped to the long arm of chromosome 10 and is homologous to bovine beta-lactoglobulin.

SUMMARY OF THE INVENTION

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

Accordingly, in one aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that includes the sequence of SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a fragment, homolog, analog or derivative thereof. The nucleic acid can include, *e.g.*, a nucleic acid sequence encoding a polypeptide at least 80% identical to a polypeptide that includes the amino acid sequences of SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16. The nucleic acid can be, *e.g.*, a genomic DNA fragment, or a cDNA molecule.

Also included in the invention is a vector containing one or more of the nucleic acids described herein, and a cell containing the vectors or nucleic acids described herein.

The invention is also directed to host cells transformed with a vector comprising any of the nucleic acid molecules described above.

In another aspect, the invention includes a pharmaceutical composition that includes an MEMX nucleic acid and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In a further aspect, the invention includes a substantially purified MEMX polypeptide, *e.g.*, any of the MEMX polypeptides encoded by an MEMX nucleic acid, and fragments,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

homologs, analogs, and derivatives thereof. The invention also includes a pharmaceutical composition that includes an MEMX polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

In still a further aspect, the invention provides an antibody that binds specifically to an MEMX polypeptide. The antibody can be, *e.g.*, a monoclonal or polyclonal antibody, and fragments, homologs, analogs, and derivatives thereof. The invention also includes a pharmaceutical composition including MEMX antibody and a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. The invention is also directed to isolated antibodies that bind to an epitope on a polypeptide encoded by any of the nucleic acid molecules described above.

The invention also includes kits comprising any of the pharmaceutical compositions described above.

The invention further provides a method for producing an MEMX polypeptide by providing a cell containing an MEMX nucleic acid, *e.g.*, a vector that includes an MEMX nucleic acid, and culturing the cell under conditions sufficient to express the MEMX polypeptide encoded by the nucleic acid. The expressed MEMX polypeptide is then recovered from the cell. Preferably, the cell produces little or no endogenous MEMX polypeptide. The cell can be, *e.g.*, a prokaryotic cell or eukaryotic cell.

The invention is also directed to methods of identifying an MEMX polypeptide or nucleic acid in a sample by contacting the sample with a compound that specifically binds to the polypeptide or nucleic acid, and detecting complex formation, if present.

The invention further provides methods of identifying a compound that modulates the activity of an MEMX polypeptide by contacting an MEMX polypeptide with a compound and determining whether the MEMX polypeptide activity is modified.

The invention is also directed to compounds that modulate MEMX polypeptide activity identified by contacting an MEMX polypeptide with the compound and determining whether the compound modifies activity of the MEMX polypeptide, binds to the MEMX polypeptide, or binds to a nucleic acid molecule encoding an MEMX polypeptide.

In another aspect, the invention provides a method of determining the presence of or predisposition of an MEMX-associated disorder in a subject. The method includes providing a sample from the subject and measuring the amount of MEMX polypeptide in the subject sample. The amount of MEMX polypeptide in the subject sample is then compared to the amount of

WO 01/44473

PCT/US00/33909

MEMX polypeptide in a control sample. An alteration in the amount of MEMX polypeptide in the subject protein sample relative to the amount of MEMX polypeptide in the control protein sample indicates the subject has a tissue proliferation-associated condition. A control sample is preferably taken from a matched individual, *i.e.*, an individual of similar age, sex, or other general condition but who is not suspected of having a tissue proliferation-associated condition. Alternatively, the control sample may be taken from the subject at a time when the subject is not suspected of having a tissue proliferation-associated disorder. In some embodiments, the MEMX is detected using an MEMX antibody.

In a further aspect, the invention provides a method of determining the presence of or predisposition of an MEMX-associated disorder in a subject. The method includes providing a nucleic acid sample, *e.g.*, RNA or DNA, or both, from the subject and measuring the amount of the MEMX nucleic acid in the subject nucleic acid sample. The amount of MEMX nucleic acid sample in the subject nucleic acid is then compared to the amount of an MEMX nucleic acid in a control sample. An alteration in the amount of MEMX nucleic acid in the sample relative to the amount of MEMX in the control sample indicates the subject has a tissue proliferation-associated disorder.

In a still further aspect, the invention provides a method of treating or preventing or delaying an MEMX-associated disorder. The method includes administering to a subject in which such treatment or prevention or delay is desired an MEMX nucleic acid, an MEMX polypeptide, or an MEMX antibody in an amount sufficient to treat, prevent, or delay a tissue proliferation-associated disorder in the subject.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present 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 the case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1: illustrates the nucleotide sequence of the Seven-Pass Transmembrane Receptor-Like Protein of the invention [SEQ ID NO:1]. The start and stop codons are shown in bold font.

FIG. 2: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:2] encoded by the coding sequence shown in FIG. 1.

FIG. 3: illustrates the BLASTN identity searches leading to the nucleic acid sequence [SEQ ID NO:1].

FIG. 4: illustrates the BLASTX identity search for the amino acid sequence [SEQ ID NO:2].

FIG. 5: illustrates the BLASTP identity search for the amino acid sequence [SEQ ID NO:2].

FIG. 6: illustrates the ClustalW alignment of the amino acid sequence [SEQ ID NO:2].

FIG. 7: illustrates the nucleotide sequence, including the sequence encoding a glutamate receptor variant (21659259 EXT 1) of the invention [SEQ ID NO:3]. The start and stop codons are shown in bold font.

FIG. 8: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:4] encoded by the coding sequence of 21659259 EXT 1 shown in FIG. 7.

FIG. 9: illustrates the BLASTN identity searches leading to the nucleic acid sequence [SEQ ID NO:3] of variant 21659259 EXT 1.

FIG. 10: illustrates the BLASTX identity search for the amino acid sequence [SEQ ID NO:4] of variant 21659259 EXT 1.

FIG. 11: illustrates the ClustalW alignment of variant 21659259 EXT 1.

FIG. 12: illustrates the nucleotide sequence, including the sequence encoding a glutamate receptor variant (21659259 EXT 2) of the invention [SEQ ID NO:5].

FIG. 13: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:6] encoded by the coding sequence of 21659259 EXT 2 of FIG. 12.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 14: illustrates the BLASTN identity searches leading to the nucleic acid sequence [SEQ ID NO:5] of variant 21659259 EXT 2.

FIG. 15: illustrates the BLASTX identity search for the amino acid sequence [SEQ ID NO:6] of variant 21659259 EXT 2.

FIG. 16: illustrates the ClustalW alignment of variant 21659259 EXT 2.

FIG. 17: illustrates the nucleotide sequence, including the sequence encoding a glutamate receptor variant (21659259 EXT 3) of the invention [SEQ ID NO:7].

FIG. 18: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:8] encoded by the coding sequence of 21659259 EXT 3 of FIG. 17.

FIG. 19: illustrates the BLASTN identity searches leading to the nucleic acid sequence [SEQ ID NO:7] of variant 21659259 EXT 3.

FIG. 20: illustrates the BLASTX identity search for the amino acid sequence [SEQ ID NO:8] of variant 21659259 EXT 3.

FIG. 21: illustrates the ClustalW alignment of variant 21659259 EXT 3.

FIG. 22: illustrates the ClustalW alignment of the three splice variants of the glutamate receptor of the present invention.

FIG. 23: illustrates the nucleotide sequence [SEQ ID NO:9] of the potassium channel protein of the invention. A putative untranslated region 5' to the start codon is shown by underlining, whereas the start and termination codons are shown in bold font.

FIG. 24: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:10] encoded by the coding sequence shown in FIG. 23.

FIG. 25: illustrates the BLASTX identity search for the protein of the invention [SEQ ID NO:10].

FIG. 26: illustrates the nucleotide sequence including the sequence encoding the phosphatase 1-like protein of the invention [SEQ ID NO:11]. Putative untranslated regions 5' to

WO 01/44473

PCT/US00/33909

the start codon and 3' to termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold font.

FIG. 27: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:12] encoded by the coding sequence shown in FIG. 26.

FIG. 28: illustrates BLASTN identity search for the nucleic acid encoding the phosphatase 1-like protein of the invention.

FIG. 29: illustrates the BLASTX identity search for the phosphatase 1-like protein of the invention.

FIG. 30: illustrates the ClustalW alignment of the phosphatase 1-like protein of the invention.

FIG. 31: illustrates the nucleotide sequence [SEQ ID NO:13], including the sequence encoding the protein resembling retinol-binding protein, of the invention. Putative untranslated regions 5' to the start codon and 3' to the termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold font.

FIG. 32: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:14] encoded by the coding sequence shown in FIG. 31.

FIG. 33: illustrates the BLASTX identity search for the retinol-binding-like protein of the invention shown in FIG. 32.

FIG. 34: illustrates the nucleotide sequence [SEQ ID NO:15], including the sequence encoding the protein resembling retinol-binding protein, of the invention.

FIG. 35: illustrates the amino acid sequence [SEQ ID NO:16] encoded by the coding sequence shown in FIG. 34.

FIG. 36: illustrates the BLASTP identity search for the retinol-binding-like protein of the invention shown in FIG. 35.

FIG. 37: illustrates the ClustalW alignment of the retinol-binding-like protein of the invention shown in FIG. 35.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 designated as "MEMX nucleic acids" or "MEMX polynucleotides" and the corresponding encoded polypeptides are referred to as "MEMX polypeptides" or "MEMX proteins." Unless indicated otherwise, "MEMX" is meant to refer to any of the novel sequences disclosed herein. Table 1, below, provides a summary of the MEMX nucleic acids and their encoded polypeptides.

TABLE 1

MEMX Assignment	Internal Identification	SEQ ID NO: (nucleic acid)	SEQ ID NO: (polypeptide)	Homology
1	Construct of AL021392, AL031588, and AL031597	1	2	Seven-Pass Transmembrane Receptor Protein
2	21659259 EXT 1	3	4	Glutamate Receptor
3	21659259 EXT 2	5	6	Glutamate Receptor
4	21659259 EXT 3	7	8	Glutamate Receptor
5	16418841	9	10	Potassium Channel Protein
6	AC016485_A	11	12	Phosphatase 1 Protein
7	AC018653_A	13	14	Retinol-Binding Protein
8	AC18653A da1	15	16	Retinol-Binding Protein

MEMX nucleic acids and their encoded polypeptides are useful in a variety of applications and contexts. The various MEMX nucleic acids and polypeptides according to the invention are useful as members of the protein families according to the presence of domains and sequence relatedness to previously described proteins. Additionally, MEMX nucleic acids and polypeptides can also be used to identify proteins that are members of the family to which the MEMX polypeptides belong.

For example, MEM1 is homologous to members of the Seven-Pass Transmembrane Receptor Protein family of proteins. Thus, the MEM1 nucleic acids and polypeptides, antibodies and related compounds according to the invention will be useful in therapeutic and diagnostic applications in immunotherapy, viral infections, neurological disorders (*e.g.*, Alzheimer's disease

WO 01/44473

PCT/US00/33909

or Parkinson's disease), cancer (e.g., breast or neuroblastoma), nephrology, and female reproductive health.

MEM2, MEM3, and MEM4 are homologous to members of the Glutamate Receptor family of proteins. Thus, the MEM2 through MEM4 nucleic acids and polypeptides, antibodies and related compounds according to the invention will be useful in therapeutic and diagnostic applications targeted to lung and/or brain. In brain, it may serve as a target receptor for treating schizophrenia or reducing neuronal damage following head injury.

MEM5 is homologous to members of the Potassium Channel Protein family of proteins. Thus, the MEM5 nucleic acids and polypeptides, antibodies and related compounds according to the invention will be useful in therapeutic and diagnostic applications in the treatment of heart and other muscular disorders (e.g., anti-arrhythmic agents), supplementation of defective clotting Factor XI in clotting deficiencies, and cobalamin-deficiencies (e.g., pernicious anemia).

MEM6 is homologous to members of the Phosphatase I Protein family of proteins. Thus, the MEM6 nucleic acids and polypeptides, antibodies and related compounds according to the invention will be useful in therapeutic and diagnostic applications in the treatment of diabetes and related disorders originating in dysregulation of glycogen metabolism.

MEM7 and MEM8 are homologous to members of the Retinol-Binding Protein family of proteins. Thus, the MEM7 and MEM8 nucleic acids and polypeptides, antibodies and related compounds according to the invention will be useful in therapeutic and diagnostic applications in the treatment of vision-related disorders (e.g., keratomalacia), and cancer and/or similar neoplastic pathologies.

The MEMX nucleic acids and polypeptides can also be used to screen for molecules, which inhibit or enhance MEMX activity or function. Additional utilities for MEMX nucleic acids and polypeptides according to the invention are disclosed herein.

MEM1

An MEM1 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to the seven-pass transmembrane receptor family of proteins. The nucleotide sequence [SEQ ID NO:1] of the novel nucleic acid (designated CuraGen Acc. Nos. AL021392, AL031588, and AL031597) encoding a novel protein resembling the seven-pass transmembrane receptor proteins is shown in FIG. 1. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Putative untranslated regions upstream from the initiation codon and downstream from the termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold letters. The amino acid sequence [SEQ ID NO:2] of the encoded protein is presented using the one-letter code in FIG. 2.

In a BlastN search of nucleic acid sequence databases (*see*, FIG. 3), it was found, *e.g.*, that the MEM1 nucleic acid sequence has 203 of 218 bases (93%) positive and 203 of 218 bases (93%) identical to sequence (designated HS1163J1) which contains: the 3' region of a gene for a novel KIAA0279-like EGF-like domain containing a protein similar to murine *Celsr1* and rat MEGF2; a novel gene for a protein similar to *C. elegans* B0035.16 and bacterial tRNA (5'-Methylaminomethyl-2-thiouridylate)-Methyltransferases; and the 3' region of a novel gene for a protein similar to murine B99.

In a search of amino acid databases, the MEM1 protein of the invention was found to have 172 of 186 amino acid residues (91%) positive with, and 162 of 186 amino acid residues (87%) identical to the seven-pass transmembrane receptor protein precursor MouseA (ptnr: PIR-ID:T14119, *see*, FIG. 4) which is a member of the *Celsr* family of seven-pass transmembrane receptor proteins which are expressed during embryogenesis in the mouse. In a BlastP search (*see*, FIG. 5), the protein of the present invention was found to have 2345 of 2632 amino acid residues (89%) positive with, and 2139 of 2632 amino acid residues (81%) identical to the amino acid residue seven-pass transmembrane receptor protein precursor MouseA.

A multiple sequence alignment is illustrated in FIG. 6, with the protein of the invention being shown on Line 2, in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences.

The novel nucleic acid of the invention encoding a protein resembling the seven-pass transmembrane receptor family of proteins includes the nucleic acid whose sequence [SEQ ID NO:1] is provided in FIG. 1, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 1, while still encoding a protein that maintains its retinol-binding activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such modifications include, by way of non-limiting

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the proteins resembling seven-pass transmembrane receptor proteins whose sequence [SEQ ID NO:2] is provided in FIG. 2. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 2, while still encoding a protein that maintains its proteins resembling retinol-binding activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or $(F_{ab})_2$, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

MEM2, MEM3, and MEM4

An MEM2, MEM3, and MEM4 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to the human glutamate receptor family of proteins. Three variants of a human glutamate receptor MEM2 (Internal identification No. 21659259 EXT 1); MEM3 (Internal identification No. 21659259 EXT 2); and MEM4 (Internal identification No. 21659259 EXT 3) are disclosed in the present invention. These differing sequences apparently result from splice variants (or a similar deletion) at the nucleic acid level and resemble a lung-specific, splice-form of a previously reported glutamate receptor (SPTREMBL-ACC:O60391). Each of the three splice variants will be discussed below.

Splice Variant 21659259 EXT 1 (MEM2)

The nucleotide sequence of one splice variant of the present invention MEM2 (Internal Identification No. 21659259 EXT 1) is shown in FIG. 7 [SEQ ID NO:3]. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with the **atg** initiation codon and ending with the **tga** termination codon. The start and termination codons are shown in bold letters. The encoded protein is illustrated using one-letter amino acid code in FIG. 8 [SEQ ID NO:4].

In this splice variant, the difference was found at amino acid residue 360, where 73 amino acids residues were shown to be deleted (*i.e.*, "spliced-out"). These amino acid residues are also present in the best Blast-X protein match (SPTREMBL-ACC:O60391). It is important

WO 01/44473

PCT/US00/33909

to note that these 73 amino acids are also spliced out in a reported glutamate receptor from human brain (SWISSPROT-ACC:Q14957). Therefore, this variant may represent an isoform of a glutamate receptor that is present in both lung and brain.

BLASTN comparisons leading to the assembly of the 21659259 EXT 1 variant of this invention are illustrated in FIG. 9. As noted above, the sequences of the present invention match a genomic sequence (SPTREMBL-ACC:O60391). In assembling and verifying the sequences, one correction was made to the SeqCalling[™] assembly, which added a G at nucleotide 104 of the assembly. It was noted that the sequencing trace appearance also suggested that another G could be present in the sequence at basepair 104. Furthermore, adding the G corrected a frame shift in the protein and resulted in a better Blast-X match with other reported glutamate receptors. This gene, 21659259 EXT 1, differs from the previously reported gene (SPTREMBL-ACC:O60391). The protein in the public database (SPTREMBL-ACC:O60391) includes 73 amino acids that are missing in the present 21659259 EXT 1 sequence. It is believed that the presently disclosed assembly (21659259 EXT 1), which is derived from fetal lung tissue, represents a splice variant of the reported protein. This represents omission of bases 22806-23025 of the genomic sequence (GENBANK-ID:AC004528).

The protein in the public database (SPTREMBL-ACC:O60391) additionally includes 6 amino acid residues at the beginning of the exon (*i.e.*, basepairs 25855-26000) of the genomic sequence (GENBANK-ID:AC004528). In the presently disclosed sequence, however, the same exon includes only the region between basepairs 25873-26000 bp, and does not contain the 18 nucleotides which lie between basepairs 25855-25873 of the genomic sequence. Accordingly, the protein variant 21659259 EXT 1 of the present invention lacks the six amino acids, present in the human and rat reference sequences, encoded by these missing bases.

Additionally, the protein found in the public database (SPTREMBL-ACC:O60391) also lacks the last exon containing 430 bp predicted by GenScan in the present invention. This exon terminates with the stop codon TGA. BLASTX comparisons used in identifying variant 21659259 EXT 1 are shown in FIG. 10.

A multiple sequence alignment of variant 21659259 EXT 1 is illustrated in FIG. 11, with the protein of the invention being shown on Line 3, in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences. The 73-residue and 6-residue deletions are shown, as is the C-terminal extension.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Splice Variant 21659259 EXT 2 (MEM3)

The nucleotide sequence [SEQ ID NO:5] of a second splice variant, MEM3 (Internal Identification No. 21659259 EXT 2), of the present invention is shown in FIG. 12. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon. The start and termination codons are shown in bold letters. The encoded protein [SEQ ID NO:6] is illustrated using the one-letter amino acid code in FIG. 13.

Two of the three distinctions found in MEM2 (the 21659259 EXT 1 variant) were also demonstrated to be present with this splice variant. However, it was believed that the eighteen nucleotide omission noted for MEM2 (21659259 EXT 1) should be included in view of the fact that this fragment is present in a variety of glutamate receptors. Thus the amino acids encoded by these nucleotides are included in the amino acid sequence of this variant.

BLASTN comparisons leading to the assembly of the 21659259 EXT 2 variant of this invention are included in FIG. 14. BLASTX comparisons used in identifying variant 21659259 EXT 2 are shown in FIG. 15.

A multiple sequence alignment is of MEM3 variant 21659259 EXT 2 given in FIG. 16, with the protein of the invention being shown on Line 3, in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences. The 73-residue deletion is shown, as is the carboxyl-terminal extension.

Splice Variant 21659259 EXT 3 (MEM4)

The nucleotide sequence [SEQ ID NO:7] of a third splice variant, MEM4 (Internal Identification No. 21659259 EXT 3), of the invention is shown in the nucleotide sequence of FIG. 17. An open reading frame was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon. The start and stop codons are in bold letters. The amino acid sequence [SEQ ID NO:8] of the encoded protein is presented using the one-letter code in FIG. 18.

One of the three distinctions found with MEM2 (21659259 EXT 1) also occur in this variant. Due to the fact that these fragments have been shown to be present in a variety of glutamate receptors, both the eighteen nucleotide omission noted for MEM2 (21659259 EXT 1), as well as the 73 amino acid deletion, were included in the sequence of this splice variant. Thus, the amino acid sequences represented by these deletions are included in the amino acid sequence of this variant.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

BLASTN comparisons leading to the assembly of MEM4 are illustrated in FIG. 19; whereas the BLASTX comparisons used in identifying MEM4 are illustrated FIG. 20. Although the match for 900 of the 901 residues of the SPTREMBL-ACC:O60391 sequence is 100% identical to that of 21659259 EXT 3, the public protein (SPTREMBL-ACC:O60391) is found to lack the terminal 143 amino acids included in the splice variants of the present invention.

ClustalW analysis comparing variant 21659259 EXT 3 with related protein sequences is illustrated in FIG. 21, with the protein of the invention being shown on Line 3. In addition, the carboxyl-terminal extension is shown.

A comparative alignment of the three splice variants of the present invention MEM2, MEM3, and MEM4 (*i.e.*, 21659259 EXT 1; 21659259 EXT 2; and 21659259 EXT 3) is shown in FIG. 22.

The novel nucleic acid of the invention encoding a glutamate receptor includes the nucleic acid whose sequence is provided in FIG. 7 [SEQ ID NO:3]; FIG. 12 [SEQ ID NO:5]; and FIG. 17 [SEQ ID NO:7], or fragments thereof. The present invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 7, 12, and 17, while still encoding a protein that maintains its glutamate receptor-like activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the following proteins: FIG. 8 [SEQ ID NO:4]; FIG. 13 [SEQ ID NO:6]; and FIG. 18 [SEQ ID NO:8]. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 8, FIG. 13, and FIG. 18, while still encoding a protein that maintains its glutamate receptor-like protein-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or $(F_{ab})_2$, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

MEM5

An MEM5 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to the potassium channel proteins. The novel nucleic acid sequence [SEQ ID NO:9] of 1110 nucleotides (Internal Identification No. 16418841_EXT) encoding a ion channel-like protein is shown in FIG. 23. An Open Reading Frame (ORF) of 828 nucleotides was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon (see, FIG. 23; [SEQ ID NO:9]). Putative untranslated regions, one upstream from the initiation codon and another downstream of the termination codon, are shown by underlining in FIG. 23, whereas the start and termination codons are shown in bold letters. The sequence of the encoded protein [SEQ ID NO:10] comprising 275 amino acid residues is presented using the one-letter amino code in FIG. 24.

In a search of sequence databases (see, FIG. 25), it was found, *e.g.*, that the nucleic acid sequence of the protein of the invention has found to have 286 of 286 amino acid residues (100%) identical to, and 286 of 286 amino acid residues (100%) positive with, the Human potassium channel protein K^HNov42 (patp:Y34130; see, International Publication No. WO 9943696 A1).

A hydrophobicity plot shows that the protein of the invention has a short, N-terminal, hydrophilic sequence (1-40 aa), followed by a hydrophobic region (41-65 aa, peak hydrophobicity = 1), followed by a hydrophilic C-terminus. Although a SignalP analysis suggests that there is no signal peptide, the hydrophobic region at 41-65 may nevertheless be a cleavable signal peptide.

The novel nucleic acid of the invention includes the nucleic acid whose sequence [SEQ ID NO:9] is provided in FIG. 23, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 23, while still encoding a protein that maintains its activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include

WO 01/44473

PCT/US00/33909

chemical modifications. Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the protein whose sequence [SEQ ID NO:10] is provided in FIG. 24. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 24, while still encoding a protein that maintains its potassium channel protein-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or (F_{ab})₂, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

MEM6

An MEM6 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to the glycogen-binding, phosphatase 1 protein family. The nucleotide sequence [SEQ ID NO:11] of the novel nucleic acid (Internal Identification No. AC016485_A) encoding a glycogen-binding protein phosphatase 1-like protein is shown in FIG. 26. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tag** termination codon. Putative untranslated regions upstream from the initiation codon and downstream from the termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold letters. The amino acid sequence [SEQ ID NO:12] of the encoded protein is presented using the one-letter code in FIG. 27.

In a search of sequence databases, it was found, for example, that the nucleic acid sequence [SEQ ID NO:11] has 763 of 903 bases (84%) identical to a rat mRNA for protein phosphatase 1 (GL-subunit) (GENBANK-ID:Y18208; *see*, FIG. 28). The amino acid sequence [SEQ ID NO:12] of the protein of the invention was found to have 255 of 284 amino acid residues (89%) identical to, and 270 of 284 residues (92%) positive with, the 284 amino acid residue hepatic glycogen-binding subunit protein phosphatase-1 from rat (ACC: Q63759; *see*, FIG. 29).

WO 01/44473

PCT/US00/33909

A multiple sequence alignment is illustrated in FIG. 30, with the protein of the invention being shown on Line 2, in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences.

The novel nucleic acid of the invention encoding a glycogen-binding protein phosphatase 1 includes the nucleic acid whose sequence [SEQ ID NO:11] is provided in FIG. 26, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 26, while still encoding a protein that maintains its glycogen-binding protein phosphatase 1-like activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the glycogen-binding protein phosphatase 1-like protein whose sequence [SEQ ID NO:12] is provided in FIG. 27. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 27, while still encoding a protein that maintains its glycogen binding protein phosphatase 1-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or (F_{ab})₂, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

MEM7

An MEM7 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to retinol-binding protein family. The nucleotide sequence [SEQ ID NO:13] of the nucleic acid (Internal Identification No. AC018653_A) encoding a novel protein resembling retinol-binding protein is shown in FIG. 31. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Putative untranslated regions upstream from the initiation codon and downstream from the termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold letters. The amino acid sequence [SEQ ID NO:14] of the encoded protein is presented using the one-letter code in FIG. 32.

In a search of sequence databases, it was found, *e.g.*, that the MEM7 amino acid sequence [SEQ ID NO:14] of the protein of the invention had 68 of 70 amino acid residues (97%) identical to, and 70 of 70 residues (100%) positive with, the Human cytostatin I protein(patp:W27561; *see*, FIG. 33).

The novel nucleic acid of the invention encoding a protein resembling retinol-binding protein includes the nucleic acid whose sequence [SEQ ID NO:13] is provided in FIG. 31, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 31, while still encoding a protein that maintains its proteins resembling retinol-binding activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the proteins resembling retinol-binding protein whose sequence [SEQ ID NO:14] is provided in FIG. 32. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 32, while still encoding a protein that maintains its proteins resembling retinol-binding activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or (F_{ab})₂, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

MEM8

An MEM8 sequence according to the invention includes a nucleic acid sequence encoding a polypeptide related to retinol-binding protein family. The nucleotide sequence [SEQ ID NO:15] of the novel nucleic acid (designated CuraGen Acc. No. AC018653A_da1) encoding a novel protein resembling retinol-binding protein is shown in FIG. 34. An Open Reading Frame (ORF) was identified beginning with an **atg** initiation codon and ending with a **tga** termination codon. Putative untranslated regions upstream from the initiation codon and downstream from the termination codon are shown by underlining, and the start and stop codons are shown in bold letters. The amino acid sequence [SEQ ID NO:16] of the encoded protein is presented using the one-letter code in FIG. 35.

In both a database analysis (*see*, FIG. 36), the amino acid sequence [SEQ ID NO:16] of the protein of the invention was found to have 135 of 135 amino acid residues (100%) positive with, and 133 of 135 residues (98%) identical to, the 135 amino acid residue Human cytostatin III protein (patp:W30891).

A multiple sequence alignment is illustrated in FIG. 37, with the protein of the invention being shown on Line 2, in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences.

The novel nucleic acid of the invention encoding a protein resembling retinol-binding protein includes the nucleic acid whose sequence [SEQ ID NO:15] is provided in FIG. 34, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in FIG. 34, while still encoding a protein that maintains its proteins resembling retinol-binding activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes nucleic acids whose sequences are complementary to those just described, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to 20% or more of the bases may be so changed.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

The novel protein of the invention includes the proteins resembling retinol-binding protein whose sequence [SEQ ID NO:16] is provided in FIG. 35. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 35, while still encoding a protein that maintains its proteins resembling retinol-binding activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed. The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as F_{ab} or $(F_{ab})_2$, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention.

MEMX Nucleic Acids

The nucleic acids of the invention include those that encode a MEMX polypeptide or protein. As used herein, the terms polypeptide and protein are interchangeable.

In some embodiments, a MEMX nucleic acid encodes a mature MEMX polypeptide. As used herein, a "mature" form of a polypeptide or protein described herein relates to the product of a naturally occurring polypeptide or precursor form or proprotein. The naturally occurring polypeptide, precursor or proprotein includes, by way of non-limiting example, the full length gene product, encoded by the corresponding gene. Alternatively, it may 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 non-limiting example, as a result of one or more naturally occurring processing steps that may take place within the 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 amino-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 amino-terminal methionine, would have residues 2 through N remaining after removal of the amino-terminal methionine. Alternatively, a mature form arising from a precursor polypeptide or protein having residues 1 to N, in which an amino-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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Among the MEMX nucleic acids is the nucleic acid whose sequence is provided in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a fragment thereof. Additionally, the invention includes mutant or variant nucleic acids of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a fragment thereof, any of whose bases may be changed from the corresponding bases shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, while still encoding a protein that maintains at least one of its MEMX-like activities and physiological functions (*i.e.*, modulating angiogenesis, neuronal development). The invention further includes the complement of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, including fragments, derivatives, analogs and homologs thereof. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications.

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that encode MEMX proteins or biologically active portions thereof. Also included are nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify MEMX-encoding nucleic acids (*e.g.*, MEMX mRNA) and fragments for use as polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification or mutation of MEMX 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 double-stranded DNA.

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

An "isolated" nucleic acid molecule is one that is separated from other nucleic acid molecules that are present in the natural source of the nucleic acid. Examples of isolated nucleic acid molecules include, but are not limited to, recombinant DNA molecules contained in a vector, recombinant DNA molecules maintained in a heterologous host cell, partially or substantially purified nucleic acid molecules, and synthetic DNA or RNA molecules. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (*i.e.*,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

sequences located at the 5' and 3' ends 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 MEMX nucleic acid molecule can contain less than about 50 kb, 25 kb, 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 from which the nucleic acid is derived. 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 molecule of the present invention, *e.g.*, a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a complement of any of this 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, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, as a hybridization probe, MEMX nucleic acid sequences 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 acid 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 MEMX 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 may 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, an oligonucleotide comprising a nucleic acid molecule less than 100 nt in length would further comprise at least 6 contiguous nucleotides of SEQ ID

WO 01/44473

PCT/US00/33909

NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a complement thereof. Oligonucleotides may be chemically synthesized and may 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, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a portion of this nucleotide sequence. A nucleic acid molecule that is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, is one that is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 that it can hydrogen bond with little or no mismatches to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, thereby forming a stable duplex.

As used herein, the term "complementary" refers to Watson-Crick or Hoogsteen base pairing between nucleotide 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, Von der Waals, hydrophobic interactions, etc. A physical interaction can be either direct or indirect. Indirect interactions may 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.

Moreover, the nucleic acid molecule of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, *e.g.*, a fragment that can be used as a probe or primer, or a fragment encoding a biologically active portion of MEMX. 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 may 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 may be synthetic or from a different evolutionary origin and may have a similar or opposite metabolic activity compared to wild-type.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Derivatives and analogs may 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 70%, 80%, 82%, 90%, 92%, 98%, or even 99% identity (with a preferred identity of 80-99%) 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. An exemplary program is the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) using the default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman (1981. *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489, which is incorporated herein by reference in its entirety).

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 a MEMX polypeptide. 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 present invention, homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a MEMX polypeptide of species other than humans, including, but not limited to, mammals, and thus can include, *e.g.*, 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 nucleotide sequence encoding human MEMX protein. Homologous nucleic acid sequences include those nucleic acid sequences that encode conservative amino acid substitutions (see below) in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, as well as a polypeptide having MEMX activity. Biological activities of the MEMX proteins are described below. A homologous amino acid sequence does not encode the amino acid sequence of a human MEMX polypeptide.

The nucleotide sequence determined from the cloning of the human MEMX gene allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning MEMX

WO 01/44473

PCT/US00/33909

homologues in other cell types, *e.g.*, from other tissues, as well as MEMX homologues from other mammals. The probe/primer typically comprises a 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 or more consecutive sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15; or an anti-sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or of a naturally occurring mutant of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15.

Probes based upon the human MEMX nucleotide sequence 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 tissue which misexpress a MEMX protein, such as by measuring a level of a MEMX-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting MEMX mRNA levels or determining whether a genomic MEMX gene has been mutated or deleted.

A "polypeptide having a biologically active portion of MEMX" refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the present 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 MEMX" can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, that encodes a polypeptide having a MEMX biological activity (biological activities of the MEMX proteins are described below), expressing the encoded portion of MEMX protein (*e.g.*, by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of MEMX. For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of MEMX can optionally include an ATP-binding domain. In another embodiment, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of MEMX includes one or more regions.

MEMX Variants

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 due to the degeneracy of the genetic code. These nucleic acids thus encode the same MEMX protein as that encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, *e.g.*, the polypeptide of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

In addition to the human MEMX nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms that lead to changes in the amino acid sequences of MEMX may exist within a population (*e.g.*, the human population). Such genetic polymorphism in the MEMX gene 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 encoding a MEMX protein, preferably a mammalian MEMX protein. Such natural allelic variations can typically result in 1-20% variance in the nucleotide sequence of the MEMX gene. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms in MEMX that are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of MEMX are intended to be within the scope of the invention.

Moreover, nucleic acid molecules encoding MEMX proteins from other species, and thus that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 are intended to be within the scope of the invention. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the MEMX cDNAs of the invention can be isolated based on their homology to the human MEMX 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. For example, a soluble human MEMX cDNA can be isolated based on its homology to human membrane-bound MEMX. Likewise, a membrane-bound human MEMX cDNA can be isolated based on its homology to soluble human MEMX.

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, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15. In another embodiment, the nucleic acid is at least 10, 25, 50, 100, 250, 500 or 750 nucleotides in length. In 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 MEMX proteins derived from species other than human) or other related sequences (*e.g.*, paralogs) can be obtained by low, moderate or high

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m 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 T_m , 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 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 620%, 70%, 72%, 82%, 90%, 92%, 98%, or 99% homologous to each other typically remain hybridized to each other. A non-limiting example of stringent hybridization conditions is 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. This hybridization is 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 sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of moderate stringency is provided.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

A non-limiting example of moderate stringency hybridization conditions are hybridization in 6X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.20% 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 may be used are well known in 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 is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 320% 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 may 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.

I. Conservative Mutations

In addition to naturally-occurring allelic variants of the MEMX sequence that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, thereby leading to changes in the amino acid sequence of the encoded MEMX protein, without altering the functional ability of the MEMX protein. 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:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of MEMX without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the MEMX proteins of the present invention, are predicted to be particularly unamenable to alteration.

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules encoding MEMX proteins that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such

WO 01/44473

PCT/US00/33909

MEMX proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, 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 720% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16. Preferably, the protein encoded by the nucleic acid is at least about 80% homologous to SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, more preferably at least about 90%, 92%, 98%, and most preferably at least about 99% homologous to SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16.

An isolated nucleic acid molecule encoding a MEMX protein homologous to the protein of can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein.

Mutations can be introduced into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 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 in 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 nonessential amino acid residue in MEMX 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 MEMX coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for MEMX biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 MEMX protein can be assayed for: (i) the ability to form protein:protein interactions with other MEMX proteins, other cell-surface proteins, or biologically active portions thereof; (ii) complex formation between a mutant MEMX protein

WO 01/44473

PCT/US00/33909

and a MEMX receptor; (iii) the ability of a mutant MEMX protein to bind to an intracellular target protein or biologically active portion thereof; (e.g., avidin proteins); (iv) the ability to bind MEMX protein; or (v) the ability to specifically bind an anti-MEMX protein antibody.

Antisense MEMX Nucleic Acids

Another aspect of the invention pertains to isolated antisense nucleic acid molecules that are hybridizable to or complementary to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 MEMX coding strand, or to only a portion thereof. Nucleic acid molecules encoding fragments, homologs, derivatives and analogs of a MEMX protein of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, or antisense nucleic acids complementary to a MEMX nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 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 MEMX. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues (e.g., the protein coding region of human MEMX corresponds to SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "non-coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding MEMX. The term "non-coding 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 MEMX disclosed herein (e.g., SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15), 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 MEMX mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or non-coding region of MEMX mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of MEMX mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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-(carboxyhydroxymethyl) 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 MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

Such 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 may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject.

MEMX Ribozymes and PNA Moieties

In still another 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 a mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes; *see*, Haselhoff and Gerlach, 1988. *Nature* 334: 585-591) can be used to catalytically-cleave MEMX mRNA transcripts to thereby inhibit translation of MEMX mRNA. A ribozyme having specificity for a MEMX-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a MEMX DNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15). 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 MEMX-encoding mRNA. *See*, *e.g.*, Cech, *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech, *et al.*, U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, MEMX mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific

WO 01/44473

PCT/US00/33909

ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. *See, e.g., Bartel, et al., 1993. Science* 261: 1411-1418.

Alternatively, MEMX gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the MEMX (*e.g., the MEMX promoter and/or enhancers*) to form triple helical structures that prevent transcription of the MEMX gene in target cells. *See, generally, Helene, 1991. Anticancer Drug Des.* 6: 569-584; Helene. *et al.* 1992. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; and Maher. 1992. *Bioassays* 14: 807-815.

In various embodiments, the nucleic acids of MEMX 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, 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 MEMX 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 MEMX can also be used, *e.g., in the analysis of single base pair mutations in a gene by, e.g., PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, e.g., S1 nucleases (Hyrup, 1996. supra); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (Hyrup, 1996 and Perry-O'Keefe, 1996., supra).*

In another embodiment, PNAs of MEMX 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 MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation. The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed (*see, e.g., 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, Mag, et al., 1989. Nucl. Acids 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 (Finn, *et al., 1996., supra*). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (*see, Petersen, et al., 1975. Bioorg. Med. Chem. Lett. 5: 1119-1124*).

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; Lemaire, 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 may 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*.

MEMX Polypeptides

A MEMX polypeptide of the invention includes the MEMX-like protein whose sequence is provided in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, while still encoding a protein that maintains its MEMX-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In some embodiments, up to 20% or more of the residues may be so changed in the mutant or variant protein. In some embodiments, the MEMX polypeptide according to the invention is a mature polypeptide.

In general, a MEMX-like variant that preserves MEMX-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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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-MEMX antibodies. In one embodiment, native MEMX proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, MEMX proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a MEMX protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

An "isolated" or "purified" 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 MEMX 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 MEMX protein 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 MEMX protein having less than about 30% (by dry weight) of non-MEMX protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), more preferably less than about 20% of non-MEMX protein, still more preferably less than about 10% of non-MEMX protein, and most preferably less than about 20% non-MEMX protein. When the MEMX 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 20% of the volume of the protein preparation.

The language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of MEMX protein 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 MEMX protein having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-MEMX chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-MEMX

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

Biologically active portions of a MEMX protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the MEMX protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, that include fewer amino acids than the full length MEMX proteins, and exhibit at least one activity of a MEMX protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the MEMX protein. A biologically active portion of a MEMX protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acids in length.

A biologically active portion of a MEMX protein of the present invention may contain at least one of the above-identified domains conserved between the MEMX proteins, *e.g.* TSR modules. 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 MEMX protein.

In an embodiment, the MEMX protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16. In other embodiments, the MEMX protein is substantially homologous to SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail below. Accordingly, in another embodiment, the MEMX protein is a protein that comprises an amino acid sequence at least about 45% homologous, and more preferably about 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, or even 99% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16 and retains the functional activity of the MEMX proteins of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16.

I. Determining Homology Between Two or More Amino Acid 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 either of the sequences being compared for optimal alignment between the sequences). 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 may be determined as the degree of identity between two sequences. The homology may 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%, 72%, 80%, 82%, 90%, 92%, 98%, or 99%, with the CDS (encoding) part of the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15.

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. The term "percentage of positive residues" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical and conservative amino acid substitutions, as defined above, occur 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 positive residues.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Chimeric and Fusion Proteins

The invention also provides MEMX chimeric or fusion proteins. As used herein, a MEMX "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a MEMX polypeptide operatively linked to a non-MEMX polypeptide. An "MEMX polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to MEMX, whereas a "non-MEMX polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not substantially homologous to the MEMX protein, *e.g.*, a protein that is different from the MEMX protein and that is derived from the same or a different organism. Within a MEMX fusion protein the MEMX polypeptide can correspond to all or a portion of a MEMX protein. In one embodiment, a MEMX fusion protein comprises at least one biologically active portion of a MEMX protein. In another embodiment, a MEMX fusion protein comprises at least two biologically active portions of a MEMX protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the MEMX polypeptide and the non-MEMX polypeptide are fused in-frame to each other. The non-MEMX polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the MEMX polypeptide.

For example, in one embodiment a MEMX fusion protein comprises a MEMX polypeptide operably linked to the extracellular domain of a second protein. Such fusion proteins can be further utilized in screening assays for compounds that modulate MEMX activity (such assays are described in detail below).

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

In another embodiment, the fusion protein is a MEMX-immunoglobulin fusion protein in which the MEMX sequences comprising one or more domains are fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family. The MEMX-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit an interaction between a MEMX ligand and a MEMX protein on the surface of a cell, to thereby suppress MEMX-mediated signal transduction *in vivo*. In one non-limiting example, a contemplated MEMX ligand of the invention is the MEMX receptor. The MEMX-immunoglobulin fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a MEMX cognate ligand. Inhibition of the MEMX ligand/MEMX interaction may be useful therapeutically for both the treatment of proliferative and differentiative disorders, *e.g.*, cancer as

WO 01/44473

PCT/US00/33909

well as modulating (*e.g.*, promoting or inhibiting) cell survival. Moreover, the MEMX-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-MEMX antibodies in a subject, to purify MEMX ligands, and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of MEMX with a MEMX ligand.

A MEMX 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, for example, 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 MEMX-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the MEMX protein.

MEMX Agonists and Antagonists

The present invention also pertains to variants of the MEMX proteins that function as either MEMX agonists (*i.e.*, mimetics) or as MEMX antagonists. Variants of the MEMX protein can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation or truncation of the MEMX protein. An agonist of the MEMX protein can retain substantially the same, or a subset of, the biological activities of the naturally occurring form of the MEMX protein. An antagonist of the MEMX protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the MEMX protein by, for example, competitively binding to a downstream or upstream member of a cellular signaling cascade which includes the MEMX 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 MEMX proteins.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Variants of the MEMX protein that function as either MEMX agonists (mimetics) or as MEMX antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of the MEMX protein for MEMX protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of MEMX variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of MEMX variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential MEMX sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (*e.g.*, for phage display) containing the set of MEMX sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential MEMX 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 MEMX sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (*see, e.g.*, Narang 1983. *Tetrahedron* 39:3; Itakura, *et al.*, 1984. *Annual Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura, *et al.*, 1984. *Science* 198: 1056; Ike, *et al.*, 1983. *Nucl. Acid Res.* 11: 477).

I. Polypeptide Libraries

In addition, libraries of fragments of the MEMX protein coding sequences can be used to generate a variegated population of MEMX fragments for screening and subsequent selection of variants of an MEMX protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of an MEMX 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 S_1 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 MEMX 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 MEMX proteins. The most widely

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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-MEMX Antibodies

Also included in the invention are antibodies to MEMX proteins, or fragments of MEMX proteins. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin (Ig) molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically binds (immunoreacts with) an antigen. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, F_{ab}, F_{ab'} and F_{(ab')₂} fragments, and an F_{ab} expression library. In general, an antibody molecule obtained from humans relates to any of the classes IgG, IgM, IgA, IgE and IgD, which differ from one another by the nature of the heavy chain present in the molecule. Certain classes have subclasses as well, such as IgG₁, IgG₂, and others. Furthermore, in humans, the light chain may be a kappa chain or a lambda chain. Reference herein to antibodies includes a reference to all such classes, subclasses and types of human antibody species.

An isolated MEMX-related protein of the invention may be intended to serve as an antigen, or a portion or fragment thereof, and additionally can be used as an immunogen to generate antibodies that immunospecifically bind the antigen, using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. The full-length protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of the antigen for use as immunogens. An antigenic peptide fragment comprises at least 6 amino acid residues of the amino acid sequence of the full length protein, such as an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, and encompasses an epitope thereof such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the full length protein or with any fragment that contains the epitope. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, or at least 15 amino acid residues, or at least 20 amino acid residues, or at least 30

WO 01/44473

PCT/US00/33909

amino acid residues. Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of the protein that are located on its surface; commonly these are hydrophilic regions.

In certain embodiments of the invention, at least one epitope encompassed by the antigenic peptide is a region of MEMX-related protein that is located on the surface of the protein, e.g., a hydrophilic region. A hydrophobicity analysis of the human MEMX-related protein sequence will indicate which regions of a MEMX-related protein are particularly hydrophilic and, therefore, are likely to encode surface residues useful for targeting antibody production. As a means for targeting antibody production, hydropathy plots showing regions of hydrophilicity and hydrophobicity may 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 of which is incorporated herein by reference in its entirety. Antibodies that are specific for one or more domains within an antigenic protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, are also provided herein.

A protein of the invention, or a derivative, fragment, analog, homolog or ortholog thereof, may be utilized as an immunogen in the generation of antibodies that immunospecifically bind these protein components.

Various procedures known within the art may be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies directed against a protein of the invention, or against derivatives, fragments, analogs homologs or orthologs thereof (see, for example, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporated herein by reference). Some of these antibodies are discussed below.

I. Polyclonal Antibodies

For the production of polyclonal antibodies, various suitable host animals (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) may be immunized by one or more injections with the native protein, a synthetic variant thereof, or a derivative of the foregoing. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, the naturally occurring immunogenic protein, a chemically synthesized polypeptide representing the immunogenic protein, or a recombinantly expressed immunogenic protein. Furthermore, the protein may be conjugated to a second protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such

WO 01/44473

PCT/US00/33909

immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor. 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.), adjuvants usable in humans such as Bacille Calmette-Guerin and *Corynebacterium parvum*, or similar immunostimulatory agents. Additional examples of adjuvants which can be employed include MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate).

The polyclonal antibody molecules directed against the immunogenic protein can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, the specific antigen which is the target of the immunoglobulin sought, or an epitope thereof, may be immobilized on a column to purify the immune specific antibody by immunoaffinity chromatography. Purification of immunoglobulins is discussed, for example, by D. Wilkinson (*The Scientist*, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

II. Monoclonal Antibodies

The term "monoclonal antibody" (MAb) or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular species of antibody molecule consisting of a unique light chain gene product and a unique heavy chain gene product. In particular, the complementarity determining regions (CDRs) of the monoclonal antibody are identical in all the molecules of the population. MAbs thus contain an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, (1975. *Nature* 256: 495). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes can be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the protein antigen, a fragment thereof or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used if cells of human

WO 01/44473

PCT/US00/33909

origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells can be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, 1984. *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur, *et al.*, *MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an in vitro binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, (1980. *Anal. Biochem.* 107: 220). Preferably, antibodies having a high degree of specificity and a high binding affinity for the target antigen are isolated.

After the desired hybridoma cells are identified, the clones can be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. Suitable culture media for this purpose

WO 01/44473

PCT/US00/33909

include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells can be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies can also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, 1994. *Nature* 368: 812-813) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

III. Humanized Antibodies

The antibodies directed against the protein antigens of the invention can further comprise humanized antibodies or human antibodies. These antibodies are suitable for administration to humans without engendering an immune response by the human against the administered immunoglobulin. Humanized forms of antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that are principally comprised of the sequence of a human immunoglobulin, and contain minimal sequence derived from a non-human immunoglobulin. Humanization can be performed following the method of Winter and co-workers (Jones, *et al.*, 1986. *Nature*, 321: 522-525; Riechmann, *et al.*, 1988. *Nature* 332: 323-327; Verhoeven, *et al.*,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

1988. *Science*, 239: 1534-1536); by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539.). In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies can also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin (Jones, *et al.*, 1986, *supra*; Riechmann, *et al.*, 1988, *supra*; Presta, 1992. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596).

IV. Human Antibodies

Fully human antibodies relate to antibody molecules in which essentially the entire sequences of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies can be prepared by 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 may be utilized in the practice of the present invention and may 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, *supra*).

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries (Hoogenboom and Winter, 1991. *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, *e.g.*, mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425;

WO 01/44473

PCT/US00/33909

5,661,016, and Marks, *et al.* (1992. *Bio/Technology* 10: 779-783); Lonberg, *et al.* (1994. *Nature* 368: 856-859); Morrison (1994. *Nature* 368: 812-813); Fishwild, *et al.*, (1996. *Nature Biotech.* 14: 845-851); Neuberger (1996. *Nature Biotech.* 14: 826); and Lonberg and Huszar (1995. *International Rev. Immunol.* 13: 65-93).

Human antibodies may additionally be produced using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. *See*, PCT Publication WO94/02602. The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the Xenomouse™ as disclosed in PCT Publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules.

An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No. 5,939,598. It can be obtained by a method including deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker; and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells contain the gene encoding the selectable marker.

A method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. It includes introducing an expression vector that contains a

WO 01/44473

PCT/US00/33909

nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a light chain into another mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication WO 99/53049.

V. F_{ab} Fragments and Single Chain Antibodies

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to an antigenic protein of the invention (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of F_{ab} expression libraries (*see, e.g.*, Huse, *et al.*, 1989 *Science* 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal F_{ab} fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen may 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 F_{ab} fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F_{(ab)₂} fragment; (iii) an F_{ab} fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent; and (iv) F_v fragments.

VI. Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for an antigenic protein of the invention. The second binding target is any other antigen, and advantageously is a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities (*see, e.g.*, Milstein and Cuellar, 1983. *Nature* 305: 537-539). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (*i.e.*, quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by

WO 01/44473

PCT/US00/33909

affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in PCT Publication WO 93/08829 (published May 13, 1993); Traunecker, *et al.*, (1991. *EMBO J.*, 10: 3655-3659).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies (*see, e.g.*, Suresh, *et al.*, 1986. *Meth. Enzymology* 121: 210).

According to another approach described in PCT Publication WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.*, tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.* alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (*e.g.* $F_{(ab')_2}$ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan, *et al.* (1985. *Science* 229: 81) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F_{(ab')_2}$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific

WO 01/44473

PCT/US00/33909

antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby, *et al.* (1992. *J. Exp. Med.* 175: 217-225) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F_{(ab')_2}$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers (Kostelny, *et al.*, 1992. *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger, *et al.* (1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported (Gruber, *et al.*, 1994. *J. Immunol.* 152: 5368).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared (Tutt, *et al.*, 1991. *J. Immunol.* 147: 60).

Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in the protein antigen of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.*, CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (Fc R), such as Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) and Fc RIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies

WO 01/44473

PCT/US00/33909

can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the protein antigen described herein and further binds tissue factor (TF).

VII. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). It is contemplated that the antibodies can be prepared in vitro using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For example, immunotoxins can be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptopbutyrimidate and those disclosed, *e.g.*, in U.S. Patent No. 4,676,980.

VIII. Effector Function Engineering

It can be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, *e.g.*, the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) can be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *See, e.g.*, Caron, *et al.*, 1992. *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195; Shopes, 1992. *J. Immunol.* 148: 2918-2922. Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described by Wolff, *et al.* (1993. *Cancer Res.* 53: 2560-2565). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities (*see, e.g.*, Stevenson, *et al.*, 1989. *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230).

IX. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (*e.g.*, an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (*i.e.*, a radioconjugate).

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, Phytolaca americana proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, sapaonaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ^{212}Bi , ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , and ^{186}Re .

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described by Vitetta, *et al.* (1987. *Science* 238: 1098). Carbon-14-labeled, 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See, PCT Publication WO94/11026.

In another embodiment, the antibody can be conjugated to a "receptor" (such streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (*e.g.*, avidin) that is in turn conjugated to a cytotoxic agent.

MEMX Recombinant Expression Vectors and Host Cells

Another aspect of the invention pertains to vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding an MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 include 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.*, MEMX proteins, mutant forms of MEMX proteins, fusion proteins, etc.).

WO 01/44473

PCT/US00/33909

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of MEMX proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, MEMX 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.*

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* 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, MEMX 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-

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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, MEMX protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (*e.g.*, 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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) MEMX protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing MEMX 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 MEMX protein has been introduced) in a suitable medium such that MEMX protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating MEMX protein from the medium or the host cell.

Transgenic MEMX 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 MEMX protein-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous MEMX sequences have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous MEMX sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of MEMX protein and for identifying and/or evaluating modulators of MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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 MEMX-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 MEMX cDNA sequences of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, can be introduced as a transgene into the genome of a non-human animal. Alternatively, a non-human homologue of the human MEMX gene, such as a mouse MEMX gene, can be isolated based on hybridization to the human MEMX 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 MEMX transgene to direct expression of MEMX 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 No. 4,736,866; No. 4,870,009; and No. 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 MEMX transgene in its genome and/or expression of MEMX 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 MEMX 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 an MEMX gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, e.g., functionally disrupt, the MEMX gene. The MEMX gene can be a human gene (e.g., the cDNA of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15), but more preferably, is a

WO 01/44473

PCT/US00/33909

non-human homologue of a human MEMX gene. For example, a mouse homologue of human MEMX gene of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, can be used to construct a homologous recombination vector suitable for altering an endogenous MEMX gene in the mouse genome. In one embodiment, the vector is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous MEMX 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 MEMX 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 MEMX protein). In the homologous recombination vector, the altered portion of the MEMX gene is flanked at its 5'- and 3'-termini by additional nucleic acid of the MEMX gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous MEMX gene carried by the vector and an endogenous MEMX gene in an embryonic stem cell. The additional flanking MEMX 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 MEMX gene has homologously-recombined with the endogenous MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX nucleic acid molecules, MEMX proteins, and anti-MEMX 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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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.*, an MEMX protein or anti-MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

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

I. 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 MEMX proteins or have a stimulatory or inhibitory effect on, *e.g.*, MEMX protein expression or MEMX 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 an MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 Kdal and most preferably less than about 4 Kdal. 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; Carcell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; Gallop, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Libraries of compounds may 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 MEMX 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 an MEMX 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 MEMX 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 MEMX 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 ^3H , 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

substrate to product. In one embodiment, the assay comprises contacting a cell which expresses a membrane-bound form of MEMX protein, or a biologically-active portion thereof, on the cell surface with a known compound which binds MEMX to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with an MEMX protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with an MEMX protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to MEMX 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 MEMX 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 MEMX protein or biologically-active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of MEMX or a biologically-active portion thereof can be accomplished, for example, by determining the ability of the MEMX protein to bind to or interact with an MEMX target molecule. As used herein, a "target molecule" is a molecule with which an MEMX protein binds or interacts in nature, for example, a molecule on the surface of a cell which expresses an MEMX 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. An MEMX target molecule can be a non-MEMX molecule or an MEMX protein or polypeptide of the invention. In one embodiment, an MEMX 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 MEMX 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 MEMX.

Determining the ability of the MEMX protein to bind to or interact with an MEMX target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In one embodiment, determining the ability of the MEMX protein to bind to or interact with an MEMX 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, IP_3 , etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target on an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (comprising an MEMX-responsive regulatory element operatively

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

In still another embodiment, an assay is a cell-free assay comprising contacting MEMX 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 MEMX protein or biologically-active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of MEMX can be accomplished, for example, by determining the ability of the MEMX protein to bind to an MEMX 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 MEMX protein can be accomplished by determining the ability of the MEMX protein further modulate an MEMX 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 MEMX protein or biologically-active portion thereof with a known compound which binds MEMX 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 an MEMX protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with an MEMX protein comprises determining the ability of the MEMX protein to preferentially bind to or modulate the activity of an MEMX target molecule.

The cell-free assays of the invention are amenable to use of both the soluble form or the membrane-bound form of MEMX protein. In the case of cell-free assays comprising the

WO 01/44473

PCT/US00/33909

membrane-bound form of MEMX protein, it may be desirable to utilize a solubilizing agent such that the membrane-bound form of MEMX 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 may be desirable to immobilize either MEMX 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 MEMX protein, or interaction of MEMX 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-MEMX 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 MEMX 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 MEMX 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 MEMX protein or its target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated MEMX 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 MEMX protein or target molecules, but which do not interfere with

WO 01/44473

PCT/US00/33909

binding of the MEMX protein to its target molecule, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or MEMX 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 MEMX protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays that rely on detecting an enzymatic activity associated with the MEMX protein or target molecule.

In another embodiment, modulators of MEMX protein expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of MEMX mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of MEMX mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of MEMX mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of MEMX mRNA or protein expression based upon this comparison. For example, when expression of MEMX 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 MEMX mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of MEMX 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 MEMX mRNA or protein expression. The level of MEMX mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting MEMX mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the MEMX 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 MEMX ("MEMX-binding proteins" or "MEMX-bp") and modulate MEMX activity. Such MEMX-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the MEMX proteins as, for example, upstream or downstream elements of the MEMX 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 MEMX is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 an MEMX-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 MEMX.

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

II. 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 MEMX sequences, SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or fragments or derivatives thereof, can be used to map the location of the MEMX genes, respectively, on a chromosome. The mapping of the MEMX sequences to chromosomes is an important first step in correlating these sequences with genes associated with disease.

Briefly, MEMX genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp in length) from the MEMX sequences. Computer analysis of the MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

hybrids containing the human gene corresponding to the MEMX 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 MEMX 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 non-coding regions of

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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 MEMX 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 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) 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 MEMX 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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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 non-coding 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 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 non-coding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The non-coding sequences can comfortably provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers that each yield a non-coding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences, such as those in SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 MEMX protein and/or nucleic acid expression as well as MEMX 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 MEMX 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 MEMX protein, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in an MEMX 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 MEMX protein, nucleic acid expression, or biological activity.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Another aspect of the invention provides methods for determining MEMX 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 MEMX in clinical trials.

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

I. Diagnostic Assays

An exemplary method for detecting the presence or absence of MEMX 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 MEMX protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) that encodes MEMX protein such that the presence of MEMX is detected in the biological sample. An agent for detecting MEMX mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to MEMX mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a full-length MEMX nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, 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 MEMX mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

One agent for detecting MEMX protein is an antibody capable of binding to MEMX protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies directed against a protein of the invention may be used in methods known within the art relating to the localization and/or quantitation of the protein (*e.g.*, for use in measuring levels of the protein within appropriate physiological samples, for use in diagnostic methods, for use in imaging the protein, and the like). In a given embodiment, antibodies against the proteins, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, that contain the antigen binding domain, are utilized as pharmacologically-active compounds.

An antibody specific for a protein of the invention can be used to isolate the protein by standard techniques, such as immunoaffinity chromatography or immunoprecipitation. Such an

WO 01/44473

PCT/US00/33909

antibody can facilitate the purification of the natural protein antigen from cells and of recombinantly produced antigen expressed in host cells. Moreover, such an antibody can be used to detect the antigenic protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the antigenic protein. Antibodies directed against the protein 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, -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 ^3H .

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 MEMX mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of MEMX mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of MEMX protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations, and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of MEMX genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of MEMX protein include introducing into a subject a labeled anti-MEMX antibody. For example, the antibody

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 one 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 MEMX protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of MEMX protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of MEMX protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of MEMX protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

The invention also encompasses kits for detecting the presence of MEMX in a biological sample. For example, the kit can comprise: a labeled compound or agent capable of detecting MEMX protein or mRNA in a biological sample; means for determining the amount of MEMX in the sample; and means for comparing the amount of MEMX 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 MEMX protein or nucleic acid.

II. 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 MEMX expression or activity. Such disorders for MEM1 include immunological conditions, viral infections, neurological disorders, Alzheimer's or Parkinson's Diseases, cancer (*e.g.*, breast or neuroblastoma), nephrology, and female reproductive health. Such disorders for MEM4 include those involving the lung and/or brain (*e.g.*, schizophrenia, or neuronal damage following head injury). Disorders for MEM5 include heart and other muscular disorders (*e.g.*, arrhythmial), clotting deficiencies, and cobalamine deficiencies (*e.g.*, pernicious anemia). Such disorders for MEM6 include those originating in dysregulation of glycogen metabolism (*e.g.*, diabetes). Such disorders for MEM7 and MEM8 include vision-related disorders (*e.g.*, keratomalacia), cancer, and other neoplastic pathologies.

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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

associated with MEMX protein, nucleic acid expression or activity. 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 MEMX expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and MEMX protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) is detected, wherein the presence of MEMX protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant MEMX 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 MEMX 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 MEMX expression or activity in which a test sample is obtained and MEMX protein or nucleic acid is detected (*e.g.*, wherein the presence of MEMX protein or nucleic acid is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant MEMX expression or activity).

The methods of the invention can also be used to detect genetic lesions in an MEMX 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 an MEMX-protein, or the misexpression of the MEMX 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 an MEMX gene; (ii) an addition of one or more nucleotides to an MEMX gene; (iii) a substitution of one or more nucleotides of an MEMX gene, (iv) a chromosomal rearrangement of an MEMX gene; (v) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of an MEMX gene, (vi) aberrant modification of an MEMX 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 an MEMX gene, (viii) a non-wild-type level of an MEMX protein, (ix) allelic loss of an MEMX gene, and (x) inappropriate post-translational modification

WO 01/44473

PCT/US00/33909

of an MEMX protein. As described herein, there are a large number of assay techniques known in the art which can be used for detecting lesions in an MEMX 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 may 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 MEMX-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 an MEMX gene under conditions such that hybridization and amplification of the MEMX 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 may 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*, Kwok, *et al.*, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177); Q β Replicase (*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 an MEMX 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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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 oligonucleotide 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 MEMX 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 MEMX gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample MEMX 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 MEMX 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 MEMX 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX 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 an MEMX sequence, *e.g.*, a wild-type MEMX 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 MEMX genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may 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 MEMX 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 may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may 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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 may 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 may 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 may 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 may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

which may be conveniently used, *e.g.*, in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving an MEMX gene.

Furthermore, any cell type or tissue, preferably peripheral blood leukocytes, in which MEMX is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein. However, any biological sample containing nucleated cells may be used, including, for example, buccal mucosal cells.

III. Pharmacogenomics

Agents, or modulators that have a stimulatory or inhibitory effect on MEMX activity (*e.g.*, MEMX gene expression), as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) disorders associated with aberrant MEMX activity. Such disorders for MEM1 include immunological conditions, viral infections, neurological disorders, Alzheimer's or Parkinson's Diseases, cancer (*e.g.*, breast or neuroblastoma), nephrology, and female reproductive health. Such disorders for MEM4 include those involving the lung and/or brain (*e.g.*, schizophrenia, or neuronal damage following head injury). Disorders for MEM5 include heart and other muscular disorders (*e.g.*, arrhythmial), clotting deficiencies, and cobalamine deficiencies (*e.g.*, pernicious anemia). Such disorders for MEM6 include those originating in dysregulation of glycogen metabolism (*e.g.*, diabetes). Such disorders for MEM7 and MEM8 include vision-related disorders (*e.g.*, keratomalacia), cancer, and other neoplastic pathologies.

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 may 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 MEMX protein, expression of MEMX nucleic acid, or mutation content of MEMX 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.*,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 MEMX protein, expression of MEMX nucleic acid, or mutation content of MEMX 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 an MEMX modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described

herein.

IV. Monitoring of Effects During Clinical Trials

Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs, compounds) on the expression or activity of MEMX (*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 MEMX gene expression, protein levels, or upregulate MEMX activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased MEMX gene expression, protein levels, or down-regulated MEMX activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease MEMX gene expression, protein levels, or down-regulate MEMX activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased MEMX gene expression, protein levels, or up-regulated MEMX activity. In such clinical trials, the expression or activity of MEMX 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 MEMX, that are modulated in cells by treatment with an agent (*e.g.*, compound, drug or small molecule) that modulates MEMX 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 MEMX 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 MEMX 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 may 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 an MEMX

WO 01/44473

PCT/US00/33909

protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the MEMX protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the MEMX protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the MEMX 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 may be desirable to increase the expression or activity of MEMX to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of MEMX 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 MEMX expression or activity. For example, disorders associated with aberrant MEM1 expression or activity include, but are not limited to, viral infections, neurological disorders (*e.g.*, Alzheimer's disease or Parkinson's disease), cancer (*e.g.*, breast or neuroblastoma), and various renal disorders. Disorders associated with aberrant MEM2, MEM3, and MEM4 expression or activity include, but are not limited to, psychiatric diseases (*e.g.*, schizophrenia) or reducing neuronal damage following head injury. Disorders associated with aberrant MEM5 expression include, but are not limited to, heart and other muscular disorders (*e.g.*, arrhythmic disorders), clotting Factor XI in clotting deficiencies, and cobalamin-deficiencies (*e.g.*, pernicious anemia). Disorders associated with aberrant MEM6 expression include, but are not limited to, glycogen-metabolism-related disorders (*e.g.*, diabetes and related disorders). Disorders associated with aberrant MEM7 and MEM8 expression include, but are not limited to, vision-related disorders (*e.g.*, keratomalacia) and cancer and/or similar neoplastic pathologies.

These methods of treatment will be discussed more fully, below.

I. 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 may be treated with Therapeutics that antagonize (*i.e.*, reduce or inhibit) activity. Therapeutics that antagonize

WO 01/44473

PCT/US00/33909

activity may be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that may 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" endogenous 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 may be treated with Therapeutics that increase (*i.e.*, are agonists to) activity. Therapeutics that upregulate activity may be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that may 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).

I. Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing, in a subject, a disease or condition associated with an aberrant MEMX expression or activity, by administering to the subject an agent that modulates MEMX expression or at least one MEMX activity. Subjects at risk for a disease that is caused or contributed to by aberrant MEMX 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 MEMX aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

alternatively, delayed in its progression. Depending upon the type of MEMX aberrancy, for example, an MEMX agonist or MEMX 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.

II. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods of modulating MEMX 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 MEMX protein activity associated with the cell. An agent that modulates MEMX protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring cognate ligand of a MEMX protein, a peptide, a MEMX peptidomimetic, or other small molecule. In one embodiment, the agent stimulates one or more MEMX protein activity. Examples of such stimulatory agents include active MEMX protein and a nucleic acid molecule encoding MEMX that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more MEMX protein activity. Examples of such inhibitory agents include antisense MEMX nucleic acid molecules and anti-MEMX 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 MEMX 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) MEMX expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a MEMX protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant MEMX expression or activity.

Stimulation of MEMX activity is desirable in situations in which MEMX is abnormally down-regulated and/or in which increased MEMX 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). Another example of such a situation is where the subject has an immunodeficiency disease (e.g., AIDS).

Antibodies of the invention, including polyclonal, monoclonal, humanized and fully human antibodies, may used as therapeutic agents. Such agents will generally be employed to treat or prevent a disease or pathology in a subject. An antibody preparation, preferably one

WO 01/44473

PCT/US00/33909

having high specificity and high affinity for its target antigen, is administered to the subject and will generally have an effect due to its binding with the target. Such an effect may be one of two kinds, depending on the specific nature of the interaction between the given antibody molecule and the target antigen in question. In the first instance, administration of the antibody may abrogate or inhibit the binding of the target with an endogenous ligand to which it naturally binds. In this case, the antibody binds to the target and masks a binding site of the naturally occurring ligand, wherein the ligand serves as an effector molecule. Thus the receptor mediates a signal transduction pathway for which ligand is responsible.

Alternatively, the effect may be one in which the antibody elicits a physiological result by virtue of binding to an effector binding site on the target molecule. In this case the target, a receptor having an endogenous ligand which may be absent or defective in the disease or pathology, binds the antibody as a surrogate effector ligand, initiating a receptor-based signal transduction event by the receptor.

A therapeutically effective amount of an antibody of the invention relates generally to the amount needed to achieve a therapeutic objective. As noted above, this may be a binding interaction between the antibody and its target antigen that, in certain cases, interferes with the functioning of the target, and in other cases, promotes a physiological response. The amount required to be administered will furthermore depend on the binding affinity of the antibody for its specific antigen, and will also depend on the rate at which an administered antibody is depleted from the free volume other subject to which it is administered. Common ranges for therapeutically effective dosing of an antibody or antibody fragment of the invention may be, by way of non-limiting example, from about 0.1 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Common dosing frequencies may range, for example, from twice daily to once a week.

III. 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 may 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 may be tested in suitable animal model systems including, but not limited to rats, mice, chicken, cows, monkeys, rabbits,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

and the like, prior to testing in human subjects. Similarly, for *in vivo* testing, any of the animal model system known in the art may be used prior to administration to human subjects.

Specific Examples

Example 1: Real Time Quantitative (RTQ) PCR Evaluation of Expression of MEM5 in Various Cells and Tissues

The quantitative expression of MEM5 (Internal Identification 16418841) was assessed in normal and tumor samples by real time quantitative PCR (TAQMAN®) performed on a Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. In the Tables contained within this Example, the following abbreviations are used:

ca. = carcinoma,	squam = squamous,
* = established from metastasis,	pl. eff = pl effusion = pleural effusion,
met = metastasis,	glio = glioma,
s cell var = small cell variant,	astro = astrocytoma,
non-s = non-sm = non-small,	neuro = neuroblastoma

96 RNA samples were normalized to internal standards such as 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 μ l and incubated for 30 min. at 48°C. cDNA (5 μ l) was then transferred to a separate plate for the TAQMAN® reaction using internal standards such as 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 μ l total reaction volume using the following parameters: 2 minutes at 50°C; 10 minutes at 95°C; 15 seconds at 95°C; and 1 minute 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 $2^{\Delta CT}$. The percent relative expression is then obtained by taking the reciprocal of this RNA difference and multiplying by 100. The average CT values obtained for β -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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

β -actin/GAPDH average CT values.

Normalized RNA (5 μ l) 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 T_m = 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'-termini of the probe, respectively. Their final concentrations were: forward and reverse primers = 900 nM each, and probe = 200nM.

The following PCR conditions were utilized. 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 (a probe specific for the target clone and another gene-specific probe multiplexed with the target probe) were set up using 1X TaqMan[™] PCR Master Mix for the PE Biosystems 7700, with 5 mM MgCl₂, dNTPs (dA, dG, dC, dU at 1:1:1:2 ratios), 0.25 U/ml AmpliTaq Gold[™] (PE Biosystems), and 0.4 U/ μ l RNase inhibitor, and 0.25 U/ μ l reverse transcriptase. Reverse transcription was performed at 48°C for 30 minutes followed by amplification/PCR cycles as follows: 95°C 10 minutes; then 40 cycles of 95°C for 15 seconds; 60°C for 1 minute.

Two sample panels were employed in the present Example. Panel 1 is a 96 well plate (usually 2 control wells and 94 test samples) whose wells are contain RNA or cDNA isolated from various human cell lines that have been established from human malignant tissues (*i.e.*, tumors). These cell lines have been extensively characterized by investigators in both academia and the commercial sector regarding their tumorigenicity, metastatic potential, drug resistance, invasive potential and other cancer-related properties. They serve as suitable tools for pre-clinical evaluation of anti-cancer agents and promising therapeutic strategies. RNA from these various human cancer cell lines was isolated by and procured from the Developmental

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Therapeutic Branch (DTB) of the National Cancer Institute (USA). Basic information regarding their biological behavior, gene expression, and resistance to various cytotoxic agents are provided by the DTB (<http://dtp.nci.nih.gov/>).

In addition, RNA or cDNA was obtained from various human tissues derived from human autopsies performed on deceased elderly people or sudden death victims (accidents, etc.). These tissues were ascertained to be free of disease and were purchased from various high quality commercial sources such as Clontech, Research Genetics, and Invitrogen.

RNA integrity from all samples was controlled for quality by visual assessment of agarose gel electrophoresis using 28S and 18S ribosomal RNA (rRNA) staining intensity ratio as a guide (2:1 to 2.5:1 28S:18S rRNA ratio) and the assuring the absence of low molecular weight RNAs indicative of degradation products.

Panel 2 is a 96 well plate (usually 2 control wells and 94 test samples) containing RNA or cDNA isolated from human tissue procured by surgeons working in close cooperation with the National Cancer Institute's Cooperative Human Tissue Network (CHTN) or the National Disease Research Initiative (NDRI). The tissues procured are derived from human malignancies and in cases where indicated many malignant tissues have "matched margins". The tumor tissue and the "matched margins" are evaluated by two independent pathologists (the surgical pathologists and again by a pathologists at NDRI or CHTN). This analysis provides a gross histopathological assessment of tumor differentiation grade. Moreover, most samples include the original surgical pathology report that provides information regarding the clinical stage of the patient. These matched margins are taken from the tissue surrounding (*i.e.*, immediately proximal) to the zone of surgery (designated "NAT", for normal adjacent tissue). In addition, RNA or cDNA was obtained from various human tissues derived from human autopsies performed on deceased elderly people or sudden death victims (accidents, etc.). These tissue were ascertained to be free of disease and were purchased from various high quality commercial sources such as Clontech, Research Genetics, and Invitrogen.

Again, RNA integrity from all samples was controlled for quality by visual assessment of agarose gel electrophoresis using 28S and 18S rRNA staining intensity ratio as a guide (2:1 to 2.5:1 28S:18S ratio) and by assuring the absence of low molecular weight RNAs indicative of degradation products. Samples are quality controlled for genomic DNA contamination by reactions run in the absence of reverse transcriptase using probe and primer sets designed to amplify across the span of a single exon.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

The following RTQ PCR of the MEM5 sequence (Internal Designation 16418841) utilizing Panel 1, is shown in Table 3, using the primer-probe set Ag765 designated in Table 2.

Table 2

Primers	Sequences	Length	Start Position	SEQ ID NO:
Forward	5'-CCAACGTGAAGGGAGCTATAT-3'	21	923	17
Probe	TET-5'-TGCTGACACCACTACACATGTCACAA-3'-TAMRA	26	953	18
Reverse	5'-CCAGCCCCCTAAAAATTCATC-3'	21	986	19

Table 3

Cell source	Rel. Expr., % 1.2tm717t	Rel. Expr., % 1.2tm917t	Rel. Expr., % 1.2tm971t	Cell source	Rel. Expr., % 1.2tm717t	Rel. Expr., % 1.2tm917t	Rel. Expr., % 1.2tm971t
Endothelial cells	22.5	22.5	22.1	Renal ca. 786-0	17.6	17.6	5.3
Endothelial cells (treated)	2.0	2.0	1.3	Renal ca. A498	27.2	27.2	22.1
Pancreas	27.7	27.7	32.5	Renal ca. RXF-393	2.8	2.8	2.5
Pancreatic ca. CAPAN 2	11.8	11.8	3.9	Renal ca. ACHN	8.7	8.7	6.9
Adrenal Gland (new lot*)	12.5	12.5	14.9	Renal ca. UO-31	16.6	16.6	4.5
Thyroid	24.8	24.8	18.7	Renal ca. TK-10	20.3	20.3	9.1
Salivary gland	35.1	35.1	33.9	Liver	6.8	6.8	6.9
Pituitary gland	33.7	33.7	44.1	Liver (fetal)	12.9	12.9	12.8
				Liver ca.			
Brain (fetal)	1.7	1.7	2.2	(hepatoblast) HepG2	8.8	8.8	3.2
Brain (whole)	11.9	11.9	13.0	Lung	11.8	11.8	10.7
Brain (amygdala)	2.9	2.9	4.4	Lung (fetal)	10.9	10.9	12.6
Brain (cerebellum)	6.6	6.6	10.0	Lung ca. (small cell)	26.2	26.2	16.5
Brain (hippocampus)	6.7	6.7	8.9	Lung ca. (small cell)	28.7	28.7	9.2
Brain (thalamus)	6.1	6.1	5.5	Lung ca. (s.cell var.)	12.5	12.5	7.7
Cerebral Cortex	7.6	7.6	0.0	Lung ca. (large cell) NCI-H460	23.7	23.7	17.1
Spinal cord	7.1	7.1	10.7	Lung ca. (non-sm. cell) A549	12.6	12.6	6.5
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	22.9	22.9	22.9	Lung ca. (non-s.cell)	7.3	7.3	6.0
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	33.5	33.5	25.9	Lung ca. (non-s.cell)	11.5	11.5	0.0
CNS ca. (astro) SW1783	7.8	7.8	6.0	Lung ca. (non-s.cl)	44.1	44.1	24.7
CNS ca.* (neuro; met) SK-N-AS	26.1	26.1	23.3	Lung ca. (squam.)	15.9	15.9	8.1
CNS ca. (astro) SF-539	16.7	16.7	11.6	Lung ca. (squam.)	21.6	21.6	16.4
CNS ca. (astro) SNB-75	19.6	19.6	12.5	NCI-H596			
CNS ca. (glio) SNB-19	65.1	65.1	27.0	Mammary gland	24.8	24.8	24.7
				Breast ca.* (pl. effusion) MCF-7	11.7	11.7	7.6
CNS ca. (glio) U251	17.2	17.2	9.0	Breast ca.* (pl.cf)			
CNS ca. (glio) SF-295	22.1	22.1	20.0	MDA-MB-231	14.3	14.3	13.4
Heart	57.8	57.8	57.4	Breast ca.* (pl. effusion) T47D	11.0	11.0	12.3
Skeletal Muscle	100.0	100.0	100.0	Breast ca. BT-549	21.2	21.2	15.3
				Breast ca. MDA-N	10.8	10.8	13.4

WO 01/44473

PCT/US00/33909

(new lot*)							
Bone marrow	7.2	7.2	7.2	Ovary	2.2	2.2	0.3
Thymus	5.6	5.6	4.2	Ovarian ca. OVCAR-3	15.5	15.5	12.5
Spleen	6.0	6.0	7.4	Ovarian ca. OVCAR-4	5.0	5.0	5.0
Lymph node	7.0	7.0	7.7	Ovarian ca. OVCAR-5	12.2	12.2	6.4
Colorectal	2.2	2.2	1.3	Ovarian ca. OVCAR-8	15.3	15.3	5.6
Stomach	12.4	12.4	15.8	Ovarian ca. IGROV-1	20.5	20.5	12.9
Small intestine	23.5	23.5	17.8	Ovarian ca.* (ascites) SK-OV-3	30.6	30.6	26.6
Colon ca. SW480	15.6	15.6	6.5	Uterus	9.2	9.2	6.3
Colon ca.* (SW480 met)SW620	38.4	38.4	15.9	Placenta	13.7	13.7	15.2
Colon ca. HT29	8.5	8.5	3.1	Prostate	20.6	20.6	16.6
Colon ca. HCT-116	20.9	20.9	10.5	Prostate ca.* (bone met)PC-3	23.7	23.7	15.5
Colon ca. CaCo-2	11.5	11.5	4.5	Testis	29.5	29.5	23.8
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	3.9	3.9	0.4	Melanoma Hs688(A).T	12.0	12.0	8.4
Colon ca. HCC-2998	35.4	35.4	21.6	Melanoma* (met) Hs688(B).T	15.9	15.9	11.0
Gastric ca.* (liver met) NCI-N87	25.5	25.5	21.0	Melanoma UACC-62	1.9	1.9	1.0
Bladder	23.0	23.0	22.5	Melanoma M14	14.4	14.4	1.7
Trachea	9.4	9.4	10.7	Melanoma LOX IMVI	8.3	8.3	2.1
Kidney	12.9	12.9	13.1	Melanoma* (met) SK-MEL-5	14.1	14.1	11.2
Kidney (fetal)	19.0	19.0	8.3	Adipose	2.1	2.1	1.0

The results in Table 3 show that the sequence of MEM5 is expressed in a wide variety of normal and cancer cell lines. With relation to normal tissues, it is more highly expressed in certain brain tumors such as CNS ca. (glio) SNB-19, colon cancer such as Colon ca.* (SW480 met)SW620, and lung cancer such as Lung ca. (non-s.cl) NCI-H522.

Additional results for MEM5 which were obtained using Panel 2 are shown in Table 4.

Table 4

Tissue source	Rel. Expr., % 2tm972t	Tissue source	Rel. Expr., % 2tm972t
83786 Kidney Ca, Nuclear grade 2 (ODO4338)	15.4	87492 Ovary Cancer (OD04768-07)	78.5
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3866)	2.1	87493 Ovary NAT (OD04768-08)	11.7
83220 CC NAT (ODO3866)	11.7	Bladder Cancer INVITROGEN A302173	7.7
83221 CC Gr.2 rectosigmoid (ODO3866)	11.7	Bladder Cancer Research Genetics RNA 1023	0.0
83222 CC NAT (ODO3866)	3.4	Breast Cancer Clontech 9100265	2.8
83235 CC Mod Diff (ODO3920)	28.9	Breast Cancer INVITROGEN A209073	1.9
83236 CC NAT (ODO3920)	30.8	Breast Cancer Res. Gen. 1024	21.8
83237 CC Gr.2 ascend colon (ODO3921)	10.4	Breast NAT Clontech 9100265	0.1
83238 CC NAT (ODO3921)	1.6	Breast NAT INVITROGEN A2090734	5.1
83239 Lung Met to Muscle (ODO4286)	1.5	GENPAK Breast Cancer 064006	17.3
83240 Muscle NAT (ODO4286)	18.4	Gastric Cancer Clontech 9060395	14.8
83241 CC from Partial Hepatectomy (ODO4309)	9.6	Gastric Cancer Clontech 9060397	3.0
83242 Liver NAT (ODO4309)	22.1	Gastric Cancer GENPAK 064005	48.6
83255 Ocular Mel Met to Liver (ODO4310)	54.7	Kidney Cancer Clontech 8120607	0.0
83256 Liver NAT (ODO4310)	25.2	Kidney Cancer Clontech 8120613	0.3
83787 Kidney NAT (ODO4338)	32.8	Kidney Cancer Clontech 9010320	0.4
83788 Kidney Ca Nuclear grade 1/2 (ODO4339)	59.1	Kidney NAT Clontech 8120608	0.1

WO 01/44473

PCT/US00/33909

83789 Kidney NAT (OD04339)	59.4 Kidney NAT Clontech 8120614	0.0
83790 Kidney Ca, Clear cell type (OD04340)	100.0 Kidney NAT Clontech 8010321	0.1
83791 Kidney NAT (OD04340)	39.2 Liver Cancer GENPAK 064003	23.8
83792 Kidney Ca, Nuclear grade 3 (OD04348)	24.2 Liver Cancer Research Genetics RNA 1026	0.8
83793 Kidney NAT (OD04348)	25.4 Liver Cancer Research Genetics RNA 1026	0.1
84135 Lung Malignant Cancer (OD03126)	5.5 NAT Stomach Clontech 9060359	14.3
84137 Lung NAT (OD03126)	9.7 NAT Stomach Clontech 9060394	11.4
84138 Lung NAT (OD04321)	4.8 NAT Stomach Clontech 9060396	5.4
84139 Melanoma Mets to Lung (OD04321)	26.2 Normal Bladder GENPAK 061001	18.8
84140 Prostate Cancer (OD04410)	26.8 Normal Breast GENPAK 061019	5.4
84141 Prostate NAT (OD04410)	41.8 Normal Colon GENPAK 061003	17.2
84871 Lung Cancer (OD04404)	2.0 Normal Kidney GENPAK 061008	11.8
84872 Lung NAT (OD04404)	0.0 Normal Liver GENPAK 061009	26.4
84875 Lung Cancer (OD04565)	55.9 Normal Lung GENPAK 061010	10.9
84877 Breast Cancer (OD04566)	7.2 Normal Ovary Res. Gen.	0.6
85960 Lung Cancer (OD04237-01)	7.0 Normal Prostate Clontech A+ 6545-1	3.9
85970 Lung NAT (OD04237-02)	12.2 Normal Stomach GENPAK 061017	12.9
85973 Kidney Cancer (OD04450-01)	20.6 Normal Thyroid Clontech A+ 6570-1**	10.3
85974 Kidney NAT (OD04450-03)	40.6 Normal Uterus GENPAK 061018	12.6
85975 Breast Cancer (OD04590-01)	31.6 Ovarian Cancer GENPAK 064008	9.3
85976 Breast Cancer Mets (OD04590-03)	39.5 Paired Liver Cancer Tissue RNA 6004-T	0.4
87070 Breast Cancer Metastasis (OD04655-05)	26.6 Paired Liver Cancer Tissue RNA 6005-T	1.3
87071 Bladder Cancer (OD04718-01)	28.3 Paired Liver Tissue RNA 8004-N	9.0
87072 Bladder Normal Adjacent (OD04718-03)	1.8 Paired Liver Tissue Research Genetics RNA 6005-N	0.8
87073 Prostate Cancer (OD04720-01)	82.5 Thyroid Cancer GENPAK 064010	17.8
87074 Prostate NAT (OD04720-02)	6.2 Thyroid Cancer INVITROGEN A302152	27.7
87472 Colon mets to lung (OD04451-01)	6.7 Thyroid NAT INVITROGEN A302153	23.2
87473 Lung NAT (OD04451-02)	4.3 Uterus Cancer GENPAK 064011	29.1
87474 Kidney Cancer (OD04622-01)	7.5 genomic DNA control	0.3
87475 Kidney NAT (OD04622-03)	1.7 87492 Ovary Cancer (OD04768-07)	78.5

The results shown in Table 4 indicate that MEM5 is expressed preferentially in certain tumor samples compared to the adjacent noncancerous tissue. These tumors include a liver metastasis, a kidney tumor, a prostate cancer, and an ovarian cancer. In addition there is high expression in additional tumor tissues that have no matching normal tissue in the panel.

Accordingly, the results in Tables 3 and 4 suggests that MEM5 may serve as a diagnostic probe for certain specific cancer types.

Example 2: Real Time Quantitative (RTQ) PCR Evaluation of Expression of MEM7 in Various Cells and Tissues

The quantitative expression of MEM7 (Internal Identification AC018653_A) was assessed in normal and tumor samples by real time quantitative PCR (TAQMAN®) performed on a Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. In the Tables contained within this Example, the following abbreviations are used:

ca. = carcinoma,	squam = squamous,
* = established from metastasis,	pl. eff = pl effusion = pleural effusion,
met = metastasis,	glio = glioma,
s cell var= small cell variant,	astro = astrocytoma,

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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

neuro = neuroblastoma

96 RNA samples were normalized to internal standards such as 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 μ l and incubated for 30 min. at 48°C. cDNA (5 μ l) was then transferred to a separate plate for the TAQMAN[®] reaction using internal standards such as 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 μ l total reaction volume using the following parameters: 2 minutes at 50°C; 10 minutes at 95°C; 15 seconds at 95°C; and 1 minute 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 $2^{\Delta CT}$. The percent relative expression is then obtained by taking the reciprocal of this RNA difference and multiplying by 100. The average CT values obtained for β -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 μ l) 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 1 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 T_m = 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'-termini of the probe, respectively. Their final concentrations were: forward and reverse primers = 900 nM

WO 01/44473

PCT/US00/33909

each, and probe = 200nM.

The following PCR conditions were utilized. 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 (a probe specific for the target clone and another gene-specific probe multiplexed with the target probe) were set up using 1X TaqMan™ PCR Master Mix for the PE Biosystems 7700, with 5 mM MgCl₂, dNTPs (dA, dG, dC, dU at 1:1:1:2 ratios), 0.25 U/ml AmpliTaq Gold™ (PE Biosystems), and 0.4 U/μl RNase inhibitor, and 0.25 U/μl reverse transcriptase. Reverse transcription was performed at 48°C for 30 minutes followed by amplification/PCR cycles as follows: 95°C 10 minutes; then 40 cycles of 95°C for 15 seconds; 60°C for 1 minute.

Two sample panels were employed in the present Example. Panel 1 is a 96 well plate (usually 2 control wells and 94 test samples) whose wells are contain RNA or cDNA isolated from various human cell lines that have been established from human malignant tissues (*i.e.*, tumors). These cell lines have been extensively characterized by investigators in both academia and the commercial sector regarding their tumorigenicity, metastatic potential, drug resistance, invasive potential and other cancer-related properties. They serve as suitable tools for pre-clinical evaluation of anti-cancer agents and promising therapeutic strategies. RNA from these various human cancer cell lines was isolated by and procured from the Developmental Therapeutic Branch (DTB) of the National Cancer Institute (USA). Basic information regarding their biological behavior, gene expression, and resistance to various cytotoxic agents are provided by the DTB (<http://dtp.nci.nih.gov/>).

In addition, RNA or cDNA was obtained from various human tissues derived from human autopsies performed on deceased elderly people or sudden death victims (accidents, etc.). These tissues were ascertained to be free of disease and were purchased from various high quality commercial sources such as Clontech, Research Genetics, and Invitrogen.

RNA integrity from all samples was controlled for quality by visual assessment of agarose gel electrophoresis using 28S and 18S ribosomal RNA (rRNA) staining intensity ratio as a guide (2:1 to 2.5:1 28S:18S rRNA ratio) and the assuring the absence of low molecular weight RNAs indicative of degradation products.

Panel 2 is a 96 well plate (usually 2 control wells and 94 test samples) containing RNA or cDNA isolated from human tissue procured by surgeons working in close cooperation with the National Cancer Institute's Cooperative Human Tissue Network (CHTN) or the National Disease

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Research Initiative (NDRI). The tissues procured are derived from human malignancies and in cases where indicated many malignant tissues have "matched margins". The tumor tissue and the "matched margins" are evaluated by two independent pathologists (the surgical pathologists and again by a pathologists at NDRI or CHTN). This analysis provides a gross histopathological assessment of tumor differentiation grade. Moreover, most samples include the original surgical pathology report that provides information regarding the clinical stage of the patient. These matched margins are taken from the tissue surrounding (*i.e.*, immediately proximal) to the zone of surgery (designated "NAT", for normal adjacent tissue). In addition, RNA or cDNA was obtained from various human tissues derived from human autopsies performed on deceased elderly people or sudden death victims (accidents, etc.). These tissue were ascertained to be free of disease and were purchased from various high quality commercial sources such as Clontech, Research Genetics, and Invitrogen.

Again, RNA integrity from all samples was controlled for quality by visual assessment of agarose gel electrophoresis using 28S and 18S rRNA staining intensity ratio as a guide (2:1 to 2.5:1 28S:18S ratio) and by assuring the absence of low molecular weight RNAs indicative of degradation products. Samples are quality controlled for genomic DNA contamination by reactions run in the absence of reverse transcriptase using probe and primer sets designed to amplify across the span of a single exon.

The following RTQ PCR of the MEM7 sequence (Internal Identification AC018653_A) utilizing Panel 1, is shown in Table 6, using the primer-probe set Ag 1387 designated in Table 5.

Table 5

Primers	Sequences	Length	Start Position	SEQ ID NO:
Forward	5'-CTGAAACCTTCATCCACACAAT-3'	22	18	20
Probe	TET-5'-TCACTGGCTACTACCGCTTTGTCTCG-3'-TAMRA	26	51	21
Reverse	5'-GCAGGTAGTCTCCATGTTCTT-3'	22	80	22

Table 6

Cell source	Rel. Expr., % 1.2tm1815t	Cell source	Rel. Expr., % 1.2tm1815t
Endothelial cells	0.1	Renal ca. 786-0	0.2
Endothelial cells (treated)	0.6	Renal ca. A498	0.7
Pancreas	0.0	Renal ca. RFX 393	0.3
Pancreatic ca. CAPAN 2	0.1	Renal ca. ACHN	0.7
Adrenal Gland (new lot)	0.4	Renal ca. UO-31	0.5
Thyroid	0.0	Renal ca. TK-10	0.3
Salivary gland	0.7	Liver	12.7
Pituitary gland	0.0	Liver (fetal)	1.4

WO 01/44473

PCT/US00/33909

Brain (fetal)	0.0	Liver ca. (hepatoblast) HepG2	1.7
Brain (whole)	0.0	Lung	0.1
Brain (amygdala)	0.0	Lung (fetal)	0.3
Brain (cerebellum)	0.0	Lung ca. (small cell) LX-1	1.1
Brain (hippocampus)	0.1	Lung ca. (small cell) NCI-H69	0.7
Brain (thalamus)	0.1	Lung ca. (s. cell var.) SHP-77	0.0
Cerebral Cortex	0.2	Lung ca. (large cell) NCI-H460	1.7
Spinal cord	0.0	Lung ca. (non-sm. cell) A549	0.6
CNS ca. (glio/astro) U87-MG	0.1	Lung ca. (non-s. cell) NCI-H23	1.3
CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	0.1	Lung ca. (non-s. cell) HOP-62	0.6
CNS ca. (astro) SW1783	0.1	Lung ca. (non-s. cl) NCI-H522	0.9
CNS ca.* (neuro; met.) SK-N-AS	0.1	Lung ca. (squamous) SW 900	0.5
CNS ca. (astro) SF-539	0.3	Lung ca. (squamous) NCI-H596	0.3
CNS ca. (astro) SNB-7/5	0.0	Mammary gland	0.3
CNS ca. (glio) SNB-19	0.1	Breast ca.* (pl. effusion) MCF-7	0.0
CNS ca. (glio) U251	0.0	Breast ca.* (pl. eff) MDA-MB-231	0.0
CNS ca. (glio) SF-295	0.3	Breast ca.* (pl. effusion) T47D	0.1
Heart	0.3	Breast ca. BT-549	0.0
Skeletal Muscle (new lot*)	0.0	Breast ca. MDA-N	0.1
Bone marrow	0.2	Ovary	0.7
Thymus	0.4	Ovarian ca. OVCAR-3	0.2
Spleen	1.5	Ovarian ca. OVCAR-4	0.2
Lymph node	1.3	Ovarian ca. OVCAR-5	1.3
Colorectal	0.0	Ovarian ca. OVCAR-8	0.3
Stomach	0.9	Ovarian ca. IGROV-1	0.3
Small intestine	1.8	Ovarian ca.* (ascites) SK-OV-3	0.4
Colon ca. SW480	0.1	Uterus	1.0
Colon ca.* (SW480 met) SW620	0.3	Placenta	0.0
Colon ca. HT29	0.3	Prostate	0.9
Colon ca. HCT-116	0.3	Prostate ca.* (bone met) PC-3	0.4
Colon ca. CaCo-2	0.5	Testis	0.0
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3886)	0.2	Melanoma Hs688(A).T	0.1
Colon ca. HCC-2998	1.5	Melanoma* (met) Hs688(B).T	0.1
Gastric ca.* (liver met) NCI-N87	0.7	Melanoma UACC-62	0.1
Bladder	2.5	Melanoma M14	0.0
Trachea	0.1	Melanoma LOX IMVI	0.0
Kidney	100.0	Melanoma* (met) SK-MEL-5	0.0
Kidney (fetal)	0.3	Adipose	1.7

Additionally, the expression of sequence MEM7 was also evaluated using the same primer-probe set, Ag1387, on Panel 2. The results are shown in Table 7.

Table 7

Tissue Source	Rel. Expr., %, 21m515f	Tissue Source	Rel. Expr., %, 21m515f
83786 Kidney Ca, Nuclear grade 2 (ODO4338)	9.9	87492 Ovary Cancer (OD04768-07)	17.7
83219 CC Well to Mod Diff (ODO3886)	3.7	87493 Ovary NAT (OD04768-08)	9.0
83220 CC NAT (ODO3886)	3.7	Bladder Cancer INVITROGEN A302173	7.9
83221 CC Gr 2 rectosigmoid (ODO3888)	3.4	Bladder Cancer Research Genetics RNA 1023	4.0
83222 CC NAT (ODO3886)	1.3	Breast Cancer Clontech 9100266	6.1
83235 CC Mod Diff (ODO3920)	10.6	Breast Cancer INVITROGEN A209073	6.6
83236 CC NAT (ODO3920)	5.0	Breast Cancer Res. Gen. 1024	9.9
83237 CC Gr 2 ascend colon (ODO3921)	4.5	Breast NAT Clontech 9100265	3.8
83238 CC NAT (ODO3921)	2.3	Breast NAT INVITROGEN A2090734	8.0
83239 Lung Met to Muscle (ODO4286)	2.6	GENPAK Breast Cancer 064006	12.8
83240 Muscle NAT (ODO4286)	6.4	Gastric Cancer Clontech 5060355	5.8
83241 CC from Partial Hepatectomy (ODO4309)	7.1	Gastric Cancer Clontech 9060397	6.3
83242 Liver NAT (ODO4309)	80.1	Gastric Cancer GENPAK 064005	12.5
83255 Ocular Met Met to Liver (ODO4310)	1.7	Kidney Cancer Clontech 8120607	8.3
83256 Liver NAT (ODO4310)	51.4	Kidney Cancer Clontech 8120613	1.0
83787 Kidney NAT (ODO4338)	11.5	Kidney Cancer Clontech 9010320	3.7
83788 Kidney Ca Nuclear grade 1/2 (ODO4339)	26.4	Kidney NAT Clontech 8120608	4.4
83789 Kidney NAT (ODO4339)	10.7	Kidney NAT Clontech 8120614	2.9
83790 Kidney Ca, Clear cell type (ODO4340)	12.0	Kidney NAT Clontech 9010321	3.1
83791 Kidney NAT (ODO4340)	9.2	Liver Cancer GENPAK 064003	23.5
83792 Kidney Ca, Nuclear grade 3 (ODO4348)	6.7	Liver Cancer Research Genetics RNA 1025	92.7

WO 01/44473

PCT/US00/33909

83753 Kidney NAT (OD04348)	12.9	Liver Cancer Research Genetics RNA 1026	16.6
84136 Lung Malignant Cancer (OD03126)	4.7	NAT Stomach Clontech 9060359	7.1
84137 Lung NAT (OD03126)	9.7	NAT Stomach Clontech 9060394	7.2
84138 Lung NAT (OD04321)	4.7	NAT Stomach Clontech 9060396	3.4
84139 Melanoma Mets to Lung (OD04321)	5.1	Normal Bladder GENPAK 061001	13.0
84140 Prostate Cancer (OD04410)	7.0	Normal Breast GENPAK 061019	8.1
84141 Prostate NAT (OD04410)	11.0	Normal Colon GENPAK 061003	5.2
84871 Lung Cancer (OD04404)	4.4	Normal Kidney GENPAK 061008	4.8
84872 Lung NAT (OD04404)	4.3	Normal Liver GENPAK 061009	100.0
84875 Lung Cancer (OD04565)	9.3	Normal Lung GENPAK 061010	5.7
84877 Breast Cancer (OD04566)	7.8	Normal Ovary Res. Gen.	7.0
85950 Lung Cancer (OD04237-01)	6.2	Normal Prostate Clontech A+ 6546-1	4.8
85970 Lung NAT (OD04237-02)	5.1	Normal Stomach GENPAK 061017	6.4
85973 Kidney Cancer (OD04450-01)	13.4	Normal Thyroid Clontech A+ 8570-1**	8.1
85974 Kidney NAT (OD04450-03)	6.3	Normal Uterus GENPAK 061018	3.0
85975 Breast Cancer (OD04590-01)	6.3	Ovarian Cancer GENPAK 064008	11.7
85976 Breast Cancer Mets (OD04590-03)	7.1	Paired Liver Cancer Tissue RNA 6004-T	54.0
87070 Breast Cancer Metastasis (OD04655-05)	9.4	Paired Liver Cancer Tissue RNA 6005-T	18.4
87071 Bladder Cancer (OD04718-01)	5.3	Paired Liver Tissue RNA 6004-N	26.1
87072 Bladder Normal Adjacent (OD04718-03)	4.8	Paired Liver Tissue Genetics RNA 6005-N	55.1
87073 Prostate Cancer (OD04720-01)	13.1	Thyroid Cancer GENPAK 064010	3.4
87074 Prostate NAT (OD04720-02)	10.4	Thyroid Cancer INVITROGEN A302152	10.7
87472 Colon mets to lung (OD04451-01)	9.5	Thyroid NAT INVITROGEN A302153	7.7
87473 Lung NAT (OD04451-02)	5.6	Uterus Cancer GENPAK 064011	10.6
87474 Kidney Cancer (OD04622-01)	27.4	Genomic DNA control	0.6
87475 Kidney NAT (OD04622-03)	7.1		

The results for MEM7 indicate expression primarily in normal kidney and lung tissue, and, for certain tumors but not all, in normal tissue adjacent to certain tumors in these organs. These results suggest that MEM7 may be used to distinguish normal from cancerous tissue.

OTHER EMBODIMENTS

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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - (a) a mature form of the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16;
 - (b) a variant of a mature form of the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, wherein any amino acid in the mature form is changed to a different amino acid, provided that no more than 20% of the amino acid residues in the sequence of the mature form are so changed;
 - (c) the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16;
 - (d) a variant of the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, wherein any amino acid specified in the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 20% of the amino acid residues in the sequence are so changed; and
 - (e) a fragment of any of (a) through (d).
2. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is a naturally occurring allelic variant of the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16.
3. The polypeptide of claim 2, wherein the allelic variant is the translation of a single nucleotide polymorphism (SNP).
4. The polypeptide of claim 1 that is a variant polypeptide described therein, wherein any amino acid specified in the chosen sequence is changed to provide a conservative substitution.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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 the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16;
 - (b) a variant of a mature form of the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, wherein any amino acid in the mature form of the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 20% of the amino acid residues in the sequence of the mature form are so changed;
 - (c) the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16;
 - (d) a variant of the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, in which any amino acid specified in the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 20% of the amino acid residues in the sequence are so changed;
 - (e) a nucleic acid fragment encoding at least a portion of a polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, or any variant of said polypeptide wherein any amino acid of the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 10% of the amino acid residues in the sequence are so changed; and
 - (f) the complement of any of said nucleic acid molecules.
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 that encodes a variant polypeptide, wherein the variant polypeptide has the polypeptide sequence of a naturally occurring polypeptide variant.
8. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule comprises a single nucleotide polymorphism encoding said variant polypeptide.
9. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein said nucleic acid molecule

WO 01/44473

PCT/US00/33909

comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of

- (a) the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15;
- (b) a nucleotide sequence wherein one or more nucleotides in the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 is changed from that given by the chosen sequence to a different nucleotide provided that no more than 20% of the nucleotides are so changed;
- (c) a nucleic acid fragment of the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15; and
- (d) a nucleic acid fragment wherein one or more nucleotides in the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15 is changed from that given by the chosen sequence to a different nucleotide provided that no more than 20% of the nucleotides are so changed.

10. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein said nucleic acid molecule hybridizes under stringent conditions to the nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, or 15, or a complement of said nucleotide sequence.

11. The nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence in which any nucleotide specified in the coding sequence of the chosen nucleotide sequence is changed from that given by the chosen sequence to a different nucleotide provided that no more than 20% of the nucleotides in the chosen coding sequence are so changed, an isolated second polynucleotide that is a complement of the first polynucleotide, or a fragment of any of them.

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.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

15. An antibody that binds immunospecifically 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 said sample;
 - (b) introducing said sample to 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 said sample;
 - (b) introducing said sample to a probe that binds to said nucleic acid molecule; and
 - (c) determining the presence or amount of said probe bound to said nucleic acid molecule, thereby determining the presence or amount of the nucleic acid molecule in said sample.
20. A method of identifying an agent that binds to the polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - (a) introducing said polypeptide to said agent; and
 - (b) determining whether said agent binds to said polypeptide.
21. A method for identifying a potential therapeutic agent for use in treatment of a pathology, wherein the pathology is related to aberrant expression or aberrant physiological interactions of the polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - (a) providing a cell expressing the polypeptide of claim 1 and having a property or function ascribable to the polypeptide;
 - (b) contacting the cell with a composition comprising a candidate substance; and determining whether the substance alters the property or function ascribable to the

WO 01/44473

PCT/US00/33909

polypeptide;
whereby, if an alteration observed in the presence of the substance is not observed when the cell is contacted with a composition devoid of the substance, the substance is identified as a potential therapeutic agent.

22. A method for modulating the activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising introducing 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.

23. A method of treating or preventing a pathology associated with the polypeptide of claim 1, said method comprising administering the polypeptide of claim 1 to a subject in which such treatment or prevention is desired in an amount sufficient to treat or prevent said pathology in said subject.

24. The method of claim 23, wherein said subject is a human.

25. A method of treating or preventing a pathology associated with the polypeptide of claim 1, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired a MEMX nucleic acid in an amount sufficient to treat or prevent said pathology in said subject.

26. The method of claim 25, wherein said subject is a human.

27. A method of treating or preventing a pathology associated with the polypeptide of claim 1, said method comprising administering to a subject in which such treatment or prevention is desired a MEMX antibody in an amount sufficient to treat or prevent said pathology in said subject.

28. The method of claim 15, wherein the subject is a human.

29. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

30. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 5 and a pharmaceutically acceptable carrier.
31. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 15 and a pharmaceutically acceptable carrier.
32. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 29.
33. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 30.
34. A kit comprising in one or more containers, the pharmaceutical composition of claim 31.
35. 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 pathology associated with the polypeptide of claim 1, wherein said therapeutic is the polypeptide of claim 1.
36. 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 pathology associated with the polypeptide of claim 1, wherein said therapeutic is a MEMX nucleic acid.
37. 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 pathology associated with the polypeptide of claim 1, wherein said therapeutic is a MEMX antibody.

WO 01/44473

PCT/US00/33909

38. A method for screening for a modulator of activity or of latency or predisposition to a pathology associated with the polypeptide of claim 1, said method comprising:

- (a) administering a test compound to a test animal at increased risk for a pathology associated with the polypeptide of claim 1, 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); and
- (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 pathology associated with the polypeptide of claim 1.

39. The method of claim 38, 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.

40. 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.

41. 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

WO 01/44473

PCT/US00/33909

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.

42. 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 20% identical to a polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, or 16, or a biologically active fragment thereof.

43. 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.

[illegible]

FIG. 1 Continued

[illegible]

[illegible]

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 2

MAPFFPVLVLLLLAAALPAMGLRAAAWEPRVPGGTRAPALRPGCTYAVGAACTPRAPRELLDVGDRGLAGRRVVS
 GAGRPLPLQVRLVARSAPTALSRRLRANTHLPCCGARAALCGTGARLCCGALCPFVFGGCAAAQHSALAAPTTLFACRCPP
 RFRPRCPGRPICLPFGGQSVRLRLCALRAAGAVRGLALEAATAGTFSASPSPPPLPPNLPEARAGPARRARRGTSGR
 GSKFPMPTQVALFENEPAGTLLQLLHAHYTIEGEEERVSYTHEGLFDERSRGYFRIDSATGAVSTDVLDRETKETHV
 LRVKAVDYSTPRASATYITVLVKDTHDSFVTEQSEYRERVRENLEVGVEVLTIRASDKDSPINAMLRKRVLGGAMDVF
 QLNESSCVSTRAVLDRBAAEYQLLYEANDQGRNPGPLSATATVYIEVEDENDNYPPFSEQNTYVQVEEDVGLANTAVLR
 VQPTDRDQGGMAAHYSILSGNVAGQPYLHSLSGILDOVINPLDFEDVVKYSLSIKAGQGRPPLINSRGVSVQVLLVND
 NEPIFVSSPPQATVLENVFLGYFVVIQAVDADSGENARLHYRLVDASTFLGSGGSAQGNPAPATDEDFQIKNSSGWIT
 VCAELOREEVEHYSPGVBAWDSPPMSSSTSVSTTVLDDNDNFVFTQPTTELRRLNEDAAVGSVLTQLQARDRDANSVT
 TYQLTGONTNRFFALSSQAGCCLITLALFLDYKQEQYVLAUTASDGTSTAHMLINVIDANTHRFPQSSHYTVSVSE
 DARVGTSLATLSANDEUTGEMARITTYITQDPVQFRIDPDSQTMTHMELDYENQVAYTILTAQDNGIPKSDTTLTLEI
 LILDANDNAQQLWDFYQOSIFEDAPBETSILQVATDRDSCPNQRLLYTPOGGDGDGDFYIEPTSGVIRTOHLDREN
 VAVYNLWALAVDRGSPPTLSASVEIQVITLIDINDNAPMEFEKDELFLVEENFVGSVVAKIRANDPDEGNQATHMYQIVE
 GOMHFFIQLDLNGLDRLAMVELOFEVRREYVLUVQATSAPLVSRAVTHILLVDQNDNFVLEDFQILPNYVTVNKSNSFP
 TGVIGCIPIAHDPDVSQSLMYTVFQGNELRLLLDPAATGELQLSRDLDNNRPLEALMEVSVSDGHSVTAFTCLRVTTIID
 DMLNINIVLENNMSQEFLLSLLALFEGVAALSTTKDDVFVFNQNDTVSSNINLVTSALLFGGVRGQFFPSEDL
 QEQIYLNRLLTLLTISTQRVLFDDNICLREPCENYMKCVSVLRFDSSAPFLSSTTVLFRPIHPIINGLRCCRPFGFTGDYC
 ETEIDLCSYDPCGANGRCRSREGGYTCECFEDFTGHECEVDARSGRCAAGVCKNGGTCVNLLIGGFHCVCPPQEYERPYC
 EVTTRSPFPQSVFTFRGLRQRPHFTISLTFATQERNGLLLYNGRFNKEHDFIALEIVDEQVQLTFSAGETTTTVAKVPFS
 GVSQGRWHSVQVQYNNKPNIGHLGLPHGFSGBEMAVTVDDCDDTMAVRFKDIKNYSCAAQGTQTSKSLDLTGPLLL
 GGVPNLPEDFPVHNRQFVGCNRLSVDGKNVDMAGFIANNQTRGCAARRNFCIDGRRCQNGCTVNRWNNYLCCECLPREF
 GKNCQAMPHPLQTSGESVVSWSDLNIIISVWYLGMLFRTRKEDSVLMEATSGGPTSPRLQILNNYLQFEVSHGSPDVE
 SVMLSGLRVTDDGWHLLTILKNVKEDEMGHLVMTLFDYMDQNKADIGGMLPGLTVRSVVVGGASEDRVSVRRGFRGC
 MCGVRMGCTPTNVATLNNMNAKVRVKDGDVDDPCTSSPCPNRCHDAWEDYSCVCDKYLGLNCDVACHLNPENMG
 ACVRSFGSPQGYVCEGQSHYGFYCNKLDLPDPCRGWGNPVCQCHCAVSKGPDPCNKITNGQCCKENYKLLAQDTC
 LECDCPHGSHSTCDMATGQCACKPGVIGRCNRCNPFPAEVTILGCEVIYNGCPKAFAGIWPQTKFGQPAAVPCPK
 GSVGRVHRCSEKGLWPELFPNCTTISFVULRAMREKLSRNETQVDGARALQLVRLRSATQHTGLFGNDVTRATQGL
 GHVLQHSWQGFELATQADPHEDTHSSALLAPATRAAWBQIQRSEGGTAQLLRLADYTSVAVANVRYTLAPV
 IYTAARILAVDIFPKNFTTGAARVPRPDTIHEEPRELESVSGPADFRPEERKECHLLRPAGRRTTPTOTRPGGTERE
 APIGRHRHHPDDAQCFALVITVYRTLQQLPERVDRDRSLRLPHREIINTPMVSTLVYSECAPLPRFLERPVAVFAL
 LEVETRTKPCVCFVNNHSLAVGGTGGWSARGCELLSRNETHVACQCSHTASFAVLMOTSRRENGEVLPLKTVTYAAVLSL
 AALLVAFVLLSVMLRSNLHSIHKHLAVLFLSLVFPVIGINQTEFFLCTVVAILLHYIMSTFANTLVESLHVYRL

TEVRNIDRGPMRFYVVGWGIPIAVTGLAVGLDPQCYGNPDFCWLSLQDTLINSFAGPIGAVIIINTVTSVLSAKVSCOR
 KHFTYKKGIVSLRTAFLLLLISATWLLGLLAVNRDALSFHYLFAIFSGLQGFVLLFHCVLNQEVKHLKGVLGGRK
 LHLDEDSATTRATLLTSLNCTNFTTGDGPDMLRTDLGEBTASLDSIVRDEGIQKLGVSGLVRGSHGEPDASLMPRSCDKP
 PQHDSDSLSLDEQSSYASSHSDSDEDDGVGAEEKWDPARGAVHSTPKGDVAVANHVPAWPDQSLAESDSDPSGKP
 RLKVVETKVSVELHREBQSGHREYFPDQESGGAARLASSQFPEQRKXILNKVITYFPPLTLTEQTLKGRRLREKLADCEQS
 PTTSSRTSLGSGGDCATVKSQPREFGROHNLNVAMNVTQSAQADGSDSEK

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 3

Score = 939 (140.9 bits), Expect = 4.0e-81, Sum P(3) = 4.0e-81
Identities = 203/218 (93%), Positives = 203/218 (93%), Strand = Plus / Plus

Query: 230 CTGTAATAGACCAACGGCCAGTGCCAAT-GCAAGGAGAATTACTACAAGCTCCTAGCCC 288
CTQ A T A A C GGC TG C T GCA GGAGAATTACTACAAGCTCCTAGCCC
Sbjct: 38281 CTGAAGTCACAGGCCCTGCCCTTGAGCTTTTGCA-GGAGAATTACTACAAGCTCCTAGCCC 38339

Query: 289 AGGACACCTGTCTGCCCTGGGACTGCTTCCCCCATGGCTCCACAGCCGCACTTGCGACA 348
AGGACACCTGTCTGCCCTGGGACTGCTTCCCCCATGGCTCCACAGCCGCACTTGCGACA
Sbjct: 38340 AGGACACCTGTCTGCCCTGGGACTGCTTCCCCCATGGCTCCACAGCCGCACTTGCGACA 38399

Query: 349 TGCCACCGGGCAGTGTGCTGCACGCCCGGCGTCATCGGCCGCCAGTGCACCGGCTGCG 408
TGCCACCGGGCAGTGTGCTGCACGCCCGGCGTCATCGGCCGCCAGTGCACCGGCTGCG
Sbjct: 38400 TGCCACCGGGCAGTGTGCTGCACGCCCGGCGTCATCGGCCGCCAGTGCACCGGCTGCG 38459

Query: 409 ACAACCCGTTTGCCGAGGTACCCACGCTCGGCTGTGAAG 447
ACAACCCGTTTGCCGAGGTACCCACGCTCGGCTGTGAAG
Sbjct: 38460 ACAACCCGTTTGCCGAGGTACCCACGCTCGGCTGTGAAG 38498

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 4

Score = 1000 (352.0 bits), Expect = 2.4e-98, P = 2.4e-98
Identities = 162/186 (87%), Positives = 172/186 (92%), Frame = +3

Query: 3 YLGINCVDACHLNPCENMGACVRSFGSPQGYVCEGFSHYGPHYCENKLDLPCPRGWGNDP 182
Y Q CVDAC LNEC+++ ACVRSF +P+GY CECGP HYG YCENK+DLPCP+GWGNDP
Sbjct: 1917 YFGKKCVDACLLNFCCKHVAACVRSFNFPRGYSCGCGPMYGGYECENKVDLPCPKGWGNDP 1976

Query: 183 VCGPCHCAVSKGFDPCNKINGQCCKENYKLLAQDTCLPCDCFPHGSHSRCDMDTGO 362
VCGPCHCAVS+GFDPCNKINGQCCKENYK AQD CLPCDCFPHGSHSR CDM TGO
Sbjct: 1977 VCGPCHCAVSQGFDPCKNKINGQCCKENYKPPAQDACLPCDCFPHGSHSRACDMDTGO 2036

Query: 61 CCTGCGTGCCTCCCCCGGCTCCCCGAGGGCTACGTGTGCGAGTGTGGGCCAGTCACT 120
|||||
Sbjct: 33445 CCTGCGTGCCTCCCCCGGCTCCCCGAGGGCTACGTGTGCGAGTGTGGGCCAGTCACT 33504

Query: 121 ACGGCCCTACTGTGAGAACAA 142
|||||
Sbjct: 33505 ACGGCCCTACTGTGAGAACAA 33526

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 5

Score = 12924 (4549.5 bits), Expect = 0.0, P = 0.0
 Identities = 2451/3034 (80%), Positives = 2677/3034 (88%)

```

Query: 1 MAPPPFVLPVLLLLAAAAALPAMGLRAAAWEPVPGGTRAFALRPGCTYAVGAACTPR- 59
      MAP P VLP L+LLAAAA LPA+ L RAAME RVFEGG RAFAL EG +Y + TPR
Sbjct: 1 MAPSSPVLPAVLLAAAA-LPALELGAAMWELRVPGGARAFALGPCWSYRLDTTTPRE 59
Query: 60 ---APRELLDVGRD-GRLAGRRRVSG-AGRFLPLQVRLVARSAPTALSRLRAATHLPGC 114
      RE GR G AG + AGR LPLQVRLVAR APTA S LRAA + C
Sbjct: 60 LLDVSRGFAAGRRRLGLGAGTLGCARLAGRLPLQVRLVARGAPTAPSLVLRARAYGARC 119
Query: 115 GARA-RLCGTGARL-----CG-ALCFVFGGCAAAQHSALAAPTTLPAACRCFPRP 162
      G R R CA L G ALCFP GG AA+ S L A T PAC CPP
Sbjct: 120 GVRLLARSARGAELRSFAVRSPVGLGDALCFPAAGGGAASLTSVLEAITNFPACSCPPVA 179
Query: 163 RPRCPGRPICLPGGSVRLRLCALRAAGAVRVGLALEAATAGTPSASPSPPPLPPNL 222
      C PICL PGGS LRL+CAL RAAGAV V L +A T+GTFS GFS SP L NL
Sbjct: 180 GTCCRRGPICLRPGGSABLRLVLCALGRAAGAVWVVLVQA-TSGTPSESFSVSPSLL-NL 237
Query: 223 PEARAGPARRARRGTSGRGSILKFMENYQVALFENEPAITLILQHAHYTIEGEEERVSY 282
      + RAG RR+RRGT S +FP+P+YQV++ ENEPAGT ++L AH EG+ R+SY
Sbjct: 238 SQPRAGVVRSRKRGTSSTSPQFLPSYQSVENEPAGTAVIELRAHDEGDAGRLSY 297
Query: 283 YMBGLFDESRGYFRIDSGAVSTOSVLDRETKETHVLKAVDYSTPPRSATTYITVL 342
      ME LFDERS GYF ID+ATGAV+T LDRETK+THVL+V AVD+ +P RSA TY+TV
Sbjct: 298 QMEALFDESRNGYFLIDAATGAVTTARSLDRETKDTHVLKVASVDHGSFRSAATYLTVT 357
Query: 343 VKDNDHSPVFPQSEYKERVRENLEVGVEVLTIRASDRSPINANLRYVLGGAWDVQFL 402
      V DNDHSPVFPQSEYKERVRENLEVGVEVLTIRAD+D P NAN+RYR+L GA VF++
Sbjct: 358 VSDNDHSPVFPQSEYKERVRENLEVGVEVLTIRATDGDAPSANMRYLLEGAGGVFEI 417
Query: 403 NESSCVVSTRAVLDRERAAEYQLLVEANDQGRNPGFLSATATVYIEVEDENDNYPQFSE 462
      + SGVV TRAV+DREERAAEYQLLVEANDQGRNPGFLSA+ATV+I VEDENDNYPQFSE+
Sbjct: 418 DARSGVTRAVVDREERAAEYQLLVEANDQGRNPGFLSATVHIVVEDENDNYPQFSEK 477
Query: 463 NYVQVQVPRDVLNTAVLRVQATDRDQGNAAIHYSILSGNVAGQFYLHSLSGILDVINPL 522
      YVQVQVQDV +NTAVLRVQATDRDQGNAAIHYSI+SGN+ GQFYLHSLSG LDVINPL
Sbjct: 478 RYVQVQVEDVAVNTAVLRVQATDRDQGNAAIHYSIVSGNLKGQFYLHSLSGLDVINPL 537
Query: 523 DFEVQVQKYSLSIKAQDGRPFPLINSSGVVSVQVLDVNDNEPIFVSSPFQATVLENVPLGY 582
      DFE +++Y+L IKAQDGRPFPLINSSG+VSVQVLDVNDN PIFVSSPFQA VLENVPLG+
Sbjct: 538 DFEAIREVTLRIKAQDGRPFPLINSSGVLVSVQVLDVNDNAPIFVSSPFQA VLENVPLGH 597
Query: 583 PVVHIQAVDADSGENARLKYRLVDTASTFLGGGSAGPKNPAPTFDPFQIHNSSGWITVC 642
      V+HIQAVDAD+GENARL YRLVDTAST +GG S +NPA PDFFQIHNSSGWITVC
Sbjct: 598 SVLHIQAVDADAGENARLYRLVDTASTIVGGSSVDSENPAAPDFFQIHNSSGWITVC 657
Query: 643 AELDREVEHYSPGVEAVDHGSPFMSSTSVSITVLDVNDNDPVFTQPYELRLNEDAAV 702
      AELDREVEHYSPGVEAVDHGSP MSBS SYSITVLDVNDNDP+PTQP YELRLNEDAAV
Sbjct: 659 AELDREVEHYSPGVEAVDHGSPFMSSSASVITVLDVNDNDPMFTQPYELRLNEDAAV 717
Query: 703 GSSVLTQARDRANSVITYQLTGENTRNREALSSQGGGLITLALPLDYKQEQVVLAV 762
      GSSVLTQ+ARDRANSVITYQLTGENTRNREALSSQ GGLITLALPLDYKQEQVVLAV
Sbjct: 718 GSSVLTQARDRANSVITYQLTGENTRNREALSSQGGGLITLALPLDYKQEQVVLAV 777
Query: 763 TASDGTRESHTAHVLMVTDANTHRPVFQSSHYTVSVSEDRPVGTSIATLSANDEDTGENA 822
      TASDGTRESHTA V INVTDANTHRPVFQSSHYTVSVSEDRPVGTSIAT+SA DEEDTGENA
Sbjct: 778 TASDGTRESHTAQVINVTDANTHRPVFQSSHYTVSVSEDRPVGTSIATISATDEDTGENA 837
Query: 823 RITVYVQDPVPQFRIDPDGQNTYTMELDYENQVAYTLTMAQDNGIPQKSDTTTLEILI 882
      RITVY++DPVPQFRIDPD+GT+YTM ELDYE+Q AYTL I AQDNGIPQKSDTTTLEILI
Sbjct: 838 RITVYVLEDPVPQFRIDPDGQNTYTMELDYEDQAAYTLTMAQDNGIPQKSDTTTLEILI 897

```

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 5 Continued

Query: 883 LDANDNAPQFLWDFYQGSIFEDAPPSTSIQVSATDRDSGPNRLLYTFQGGDDGDGFY 942
 LDANDNAP+FL DFYQGS+FEDAPPSTSI+LQVSATDRDSGPNRLLYTFQGGDDGDGFY
 Sbjct: 898 LDANDNAPFLADFYQGSVFEDAPPSTSVLQVSATDRDSGPNRLLYTFQGGDDGDGFY 957

Query: 943 IEPFSGVIRTPQRLDRENVAVYNLWALAVDRGSPPLSASVETQVTLIDINDNAPMEFKD 1002
 IEPFSGVIRTPQRLDRENVAVYNLWALAVDRGSPPLSASV IQV++LDINDN P+FEKD
 Sbjct: 958 IEPFSGVIRTPQRLDRENVAVYNLWALAVDRGSPNPLSASVGIQVSLDINDNPPVFEKD 1017

Query: 1003 ELELFVEENPFVGSVVAIRANDPDEGPNQIMYQIVGDMRHFFQOLDLNGDLRAMVEL 1062
 ELELFVEEN+PVGSVVA+IRANDPDEGPNQI+YQIVG++ FQOLDL+GDLRA+VEL
 Sbjct: 1018 ELELFVEENPFVGSVVAIRANDPDEGPNQIIYQIVGDNPEVQOLDLNGDLRALVEL 1077

Query: 1063 DFEVRREYVLVVQATSAPLVSRATVHILLVDQNDNPFVLPDFQILFNNVYTNKSNSFPTG 1122
 DFEVR+Y+LVVQATSAPLVSRATVHI L+DQNDNPF LPDFQILFNNVYTNKSNSF+G
 Sbjct: 1078 DFEVRDYGLVVQATSAPLVSRATVHILLVDQNDNPFELPDFQILFNNVYTNKSNSFPG 1137

Query: 1123 VIGCIPAHDPDVSDSLNYTFVQGNELRLLLDPATGELQLSRDLNNRPLEALMEVSVSD 1182
 VIG IPAHDPD+SDSLNYTF+QGNEL LLLDPATGELQLSRDLNNRPLEALMEVSVSD
 Sbjct: 1138 VIGCIPAHDPDVSDSLNYTFVQGNELRLLLDPATGELQLSRDLNNRPLEALMEVSVSD 1197

Query: 1183 GHSVTAPCTLRVTIITDDMLTNSITVRLENMSQKFLSPLLLFVEGVAALSTTKDDV 1242
 GHSVTAP CTLRVTIITDDMLTNSITVRLENMSQKFLSPLLLFVEGVA VLSTTKDD+
 Sbjct: 1198 GHSVTAPCTLRVTIITDDMLTNSITVRLENMSQKFLSPLLLFVEGVAALSTTKDDV 1257

Query: 1243 FVFH+QNDTQVSSNINLVTFSALEPGCTGRFPFSEDLEQIYLNRTLLTISTQRVLPP 1302
 FVFH+QNDTQVSSNINLVTFSALEPGCTGRFPFSEDLEQIYLNRTLLTISTQRVLPP
 Sbjct: 1258 FVFH+QNDTQVSSNINLVTFSALEPGCTGRFPFSEDLEQIYLNRTLLTISTQRVLPP 1317

Query: 1303 DDNICLREPCENTYMKCVSVLRFDSSAPF+SSTTVLFRPIHPI GLRCRCPPGFTGDYCET 1362
 DDNICLREPCENTYMKCVSVLRFDSSAPF+SSTTVLFRPIHPI GLRCRCPPGFTGDYCET
 Sbjct: 1318 DDNICLREPCENTYMKCVSVLRFDSSAPF+SSTTVLFRPIHPI GLRCRCPPGFTGDYCET 1377

Query: 1363 EIDLKYSDFPCGANGRCRSREGGYTCCEFDFTGHEHCVDARSRCANGVCNKGTCVNL 1422
 EIDLKYS+PCGANGRCRSREGGYTCCEFDFTGHEHC+V+ RSGCA+GVCNKGTCVNL
 Sbjct: 1378 EIDLKYSNFCGANGRCRSREGGYTCCEFDFTGHEHCQVNRSGRCASGVCNKGTCVNL 1437

Query: 1423 IGGFHCVCPPGEYERPYCEVTRSFPPQSFVTFRGLRQRFHFTISLTPATQERNGLLYN 1482
 IGGFHCVCPPGEYERPYCEV+TRSFPPQSFVTFRGLRQRFHFT+SL FATQ+RN LLLYN
 Sbjct: 1438 IGGFHCVCPPGEYERPYCEVTRSFPPQSFVTFRGLRQRFHFTVSLAFATQORNALLYN 1497

Query: 1483 GRFNEKHDFIALEIVDEQVLTFSAGETTTTVAKPVSQVSDGRWHVSVQVYNNKPNIGH 1542
 GRFNEKHDFIALEIV+EQ+QLTFSAGETTTT V+VP GVSDGRWHVSV VQYNNKPNIGH
 Sbjct: 1498 GRFNEKHDFIALEIVDEQVLTFSAGETTTTVPQVFGVSDGRWHVSVVQYNNKPNIGH 1557

Query: 1543 LGLPHGPSGEKMAVVTVDCCDTMAVRFGKDIGNYSCAAQCTQSGSKSLDLTGPLLLGG 1602
 LGLPHGPSGEK+AVVTVDCCD +AV FG +GNYSCAAQCTQ+GSKSLDLTGPLLLGG
 Sbjct: 1558 LGLPHGPSGEKMAVVTVDCCDAAVAVHFGSYVQNYSCAAQCTQSGSKSLDLTGPLLLGG 1617

Query: 1603 VFNLPEDFPVHNRQFVGCNRNLSVDGKNVDMAGFIANNGTREGCAARRNFCGRRCCQNGG 1662
 VFNLPEDFPVH+RQFVGCNRNLS+DG+ VDMA FIANNGTREGCA++RNFCDG CQNGG
 Sbjct: 1618 VFNLPEDFPVHNRQFVGCNRNLSIDGRIVDMAAFIANNGTREGCASQRNFCDCGTCQNGG 1677

Query: 1663 TCVRNRYNLYCECEPLRFGGKNCQAMPHPQLFSGESVVSNSDLNIIISVPWYLGMLFRTR 1722
 TCVRNRYN YLCECEPLRFGGKNCQAMPHPQ F+GESVV WSDL+I ISVPWYLGMLFRTR
 Sbjct: 1678 TCVRNRYNLYCECEPLRFGGKNCQAMPHPQRPTGESVVLWSDLDITISVPWYLGMLFRTR 1737

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 5 Continued

Query: 2563 VRNIDTGPMPREYTVVGWGIPIAIVTGLAVGLDPQGYGNPFCWLSLQDTLIWSFAGPIGAV 2622
 VRNIDTGPMPREYTVVGWGIPIAIVTGLAVGLDPQGYGNPFCWLSLQDTLIWSFAGP+G V
 Sbjct: 2578 VRNIDTGPMPREYTVVGWGIPIAIVTGLAVGLDPQGYGNPFCWLSLQDTLIWSFAGPVGTV 2637

Query: 2623 IIINTVTSVL SAKVSCQRKHRYGKKGIVSLRTAFLLLLLISATWLLGLLAVNRDLSF 2682
 IIINTV VLSAKVSCQRKHRY +KG+VS+LRTAFLLLLL++ATWLLGLLAVN D LSF
 Sbjct: 2638 IIINTVIFVLSAKVSCQRKHRYERKGVVSMRLTAFLLLLLVATWLLGLLAVNSDTLSF 2697

Query: 2683 HYLPAIFSGLQGPVLLFHCVLNQEVRLKHLGVLCGRFLHLED SATTRATLLTRSLNCT 2742
 HYLFA FS LQC FVLLFHCV ++EVRKHL+ VL G+KL L+DEATTRATLLTRSLNCT
 Sbjct: 2698 HYLFAAFSCLQGIFVLLFHCVAHREVRKHLRAVLAKKLLQLDSDATTRATLLTRSLNCT 2757

Query: 2743 TFGDGFMLRTDLGESTASLDSIVRDEGIQKLGVSGLVRGSHGEPDASLMPSCKDPPG 2802
 T+ +GPDMLRT LGESTASLDS RDEG+QKL VSSG RG+HGEPD S +PR+ K G
 Sbjct: 2758 TYSEGPFMLRTALGESTASLDSITRDEGVQKLSVSSGFARGNHGEPDTSFIPRISKKAHG 2817

Query: 2803 HDSOSSELSLDEQSSSYASSHSSDSEDDGVGAEEKWDPAAGAVHSTPKGDVAVNHVPAG 2862
 DSDSSELSLDE SSSYASSH+SDSEDDG AE+RW+PA G HSTPK DA+ANHVPA
 Sbjct: 2818 PDSDSSELSLDEHSSSYASSHTSDSEDDGGAEDKWNPAAGPAHSTFKADALANHVPA 2877

Query: 2863 WPDQSLAESDSEDPGKPKLVETKVSVELHREEQSHRGEPDQESGGAAR---LASS 2919
 WPD+SLA SDSE+ +P LKVEVKVSVELH+ QG+H G+ P D ESG A+ + SS
 Sbjct: 2878 WPDSELAGSDEELDTEPHLKVEVKVSVELHQAQGNHCGDRPSPDSGVLAKPVAVLSS 2937

Query: 2920 QPPQRKGLKLNKVTYPPPLTLTQTLKGLREKLADCEQSPSSRTSSLSGSG---GPD 2975
 QP QPKKGLKLNKVTYPPPL EQ LK RLREKLADCEQSPSSRTSSLSGSG D
 Sbjct: 2938 QPQQRKGLKLNKVTYPPPLP--EQPLKRLREKLADCEQSPSSRTSSLSGSGGVHATD 2993

Query: 2976 CAITVKSPGREPGRDHLNGVAMNVRTGSAQADGSDSEKP 3014
 C IT+K+P REPGR+HLNGVAMNVRTGSAQA+GSDSEKP
 Sbjct: 2996 CVITIKTPRRRPGRHLNGVAMNVRTGSAQANGSDSEKP 3034

FIG. 6

[illegible]

FIG. 6 Continued

[illegible]

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 6 Continued

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
QSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
PSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
PSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
EQANSGARLPSPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
EQANSGARLPSPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
EQANSGARLPSPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
DPPQPADQGHMUNLSDSWMHNGSMARFENLTERGVYLAAPRLSDESLAMP
DPPQPADQGHMUNLSDSWMHNGSMARFENLTERGVYLAAPRLSDESLAMP
DPPQPADQGHMUNLSDSWMHNGSMARFENLTERGVYLAAPRLSDESLAMP

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
HVVYAAATKERTAAALSLSPKLSKRGIFARFASAAQMAEITNHRHNGUL
HVVYAAATKERTAAALSLSPKLSKRGIFARFASAAQMAEITNHRHNGUL
HVVYAAATKERTAAALSLSPKLSKRGIFARFASAAQMAEITNHRHNGUL

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
FALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALST
FALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALST
FALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALSTFALLNGFALST

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
PSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
PSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
PSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
TTPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
TTPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ
TTPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLVVALGSLDAQ

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
TPACLSMAAPLSPAPSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAY
TPACLSMAAPLSPAPSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAY
TPACLSMAAPLSPAPSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAYNTALSPSSGAY

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
DQDSQSRSLRDNVTHGSTAENHSLQAHAGTOLDVAMFHRDAAGTOLDVAMFHRDA
DQDSQSRSLRDNVTHGSTAENHSLQAHAGTOLDVAMFHRDAAGTOLDVAMFHRDA
DQDSQSRSLRDNVTHGSTAENHSLQAHAGTOLDVAMFHRDAAGTOLDVAMFHRDA

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
EPRN..LRIIPSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLV
EPRN..LRIIPSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLV
EPRN..LRIIPSPSPSERVLPSSNENNTAEGVVEPPALE..VDESPDISVDELLV

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
PAACALQAWGRRRLGNKDAANNNGTASTGDETSMDAQRKGIKKNLQGE
PAACALQAWGRRRLGNKDAANNNGTASTGDETSMDAQRKGIKKNLQGE
PAACALQAWGRRRLGNKDAANNNGTASTGDETSMDAQRKGIKKNLQGE

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
LVPTRTPELSWCRTHSHRAYAASYPRAYAGGOTGSPHOSARYSREOQLLEPR
LVPTRTPELSWCRTHSHRAYAASYPRAYAGGOTGSPHOSARYSREOQLLEPR
LVPTRTPELSWCRTHSHRAYAASYPRAYAGGOTGSPHOSARYSREOQLLEPR

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
QFERERLEVVVAPVLMPLRPSSQERLTPARLEHORESTLPNCPHRYPTENQ
QFERERLEVVVAPVLMPLRPSSQERLTPARLEHORESTLPNCPHRYPTENQ
QFERERLEVVVAPVLMPLRPSSQERLTPARLEHORESTLPNCPHRYPTENQ

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
RFGKRDLDLMAFRLWLTLPPLPPRRNKDLPQHPPLPLSPQRPLSRDPLLPSPRLDLSR
RFGKRDLDLMAFRLWLTLPPLPPRRNKDLPQHPPLPLSPQRPLSRDPLLPSPRLDLSR
RFGKRDLDLMAFRLWLTLPPLPPRRNKDLPQHPPLPLSPQRPLSRDPLLPSPRLDLSR

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
ISNRERKLDQVPSRNPSPREALQAPAPQLLRAREDPAQSPSHGPEQLDILSSILASFNS
ISNRERKLDQVPSRNPSPREALQAPAPQLLRAREDPAQSPSHGPEQLDILSSILASFNS
ISNRERKLDQVPSRNPSPREALQAPAPQLLRAREDPAQSPSHGPEQLDILSSILASFNS

Rat_MEQF2
Assembled_CDS
Mouse_Cell
ALESVQSSGTPSPHHTATPSATASALGSPSTREATSMISILESPDSEYPRSECHE
ALESVQSSGTPSPHHTATPSATASALGSPSTREATSMISILESPDSEYPRSECHE
ALESVQSSGTPSPHHTATPSATASALGSPSTREATSMISILESPDSEYPRSECHE

PCT/US00/33909

[illegible]

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 8

IEFVRAIWLQALALQPGSAGGHFQPCGVRLARLGGSVRLGALLPRAPLARARARAALARAALAPRLPH
LSLELVVAAPPARDPASLTRLQCALVPPGVAALLAFPEARPELLQLHFLAAATETPVLISLLRREARAP
GAPNPFHLQLHWASPLETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCRTQDPGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLS
RDTGDAGLRARLAPMAAFVGGEPVPAAVLLGCDIARARRVLEAVPPGPHWLLGTPLFPKALFTAGLP
GLLALGEVARPPLAAIHIDIVQLVARALGSAAQVQPKRALLPAPVNCODLQAPGPESPRFLARFLANT
FQGRTPVWVTGSSPDEDGQCFAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCIDLLER
AEDTPDFELYLVGDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTSPFFSTSLGI
TVRARDTASPIGAFMWPLHWSTWLGVPFAALHLTALFLTVEYWRSPYGLTPRCRNRSTVFSYSALNLC
AILFRRTVSSKTPKCTGRLLMNLWAFCLLVLSYANLAAMVVDKTFEELSGIHDPKGFRFGTVWE
SAEAYIKSFDMHAMRRHSAPTTPRGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLDYEVSIDADCKLLTVGKPF
JEGYIGLQNSPLTSLSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKMFVPCGKRVEAVTETLQMSYHFAGLFVLLC
QLGSALLSSLQSHAFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRALNTEPPEGSKEETAEEPSGPEVEQQQ
IQDQPTAFEGWKARRAVDKERRVRFLLEPAVVVAPEADAEABAPREGPVWLCYGRPPAARFTGAP
PGELELERREIARERLRQALVRRGQLLAQLGDSARHRPRILLQARAAPAEAPPHSGRPGSQE

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 9

Score = 3832 (575.0 bits), Expect = 0.0, Sum P(5) = 0.0
 Identities = 928/1076 (86%), Positives = 928/1076 (86%), Strand = Plus / Plus

```

Query:   788  CACTGCCGCCAAGGCCCTGCCACCGCGGGGCTGCCACCAAGGGCTGCTGGCGCTGGCG 847
          C CTGCC CC A G CCG CCA C CG CT CCA GC C GGC C G G G
Sbjct:  22736 CCGTGGC-CCTAGGTTCCTGGCCAAACAGTC-CTTCCAGGGCCGCA-CGGGCCCGTGTG 22792

Query:   848  AGGTGGCAG-ACCCCGCTGG-AGGCC-G-C-CATC-CATGACATTGTGCAACTGGTGG 901
          GGTG CA G A C CC C GG A C G C C C C T A TGTG A C T G
Sbjct:  22793 -GGTGACAGGCAGTCC-CAGGTACACATGTCTCGGCACCTTAAGGTGTGGAGCCT-TCG 22849

Query:   902  CCGGGGCGCT-GGGCAGTGGGCCAGGTGCAGCCGAAGCGAGCCCTCTCCCGCCCG 960
          CC GG C C GGG G C G CC GG CA C G G AGC C C GGC G
Sbjct:  22850 CCGGACCCACGGGGCGCCCGGCTGGGCCA-CGGTGGGCACTGGCGGGAGGCCA-G 22907

Query:   961  GTCAACTGGGGGACCTGCAGCGGGCCGGGCGGAGTCCCGGGGCG-CTTCTTGGCAGC 1019
          T ACT GG ACC G AG G C GC CG C CCGG C C TG C G
Sbjct:  22908 CTGGACTT--GGAACCGGAGGTGCTCTGACAG-GCCCCGCCCCACAGGGTGCACG 22964

Query:   1020 GTTCCTGGCC-AA-CA-CGTCTTCAGGGCCGCAAGGCG-CCCGTGTGGTGCACGCA 1075
          GT CTGGCC AA C CCG T A GC G G C CCG T TG GT G C
Sbjct:  22965 GT--CTGCCCAAGCTGCGTG-TGGTAACGCTGTTGGAACACCCATTGTGTGT--GCCC 23019

Query:   1076 GCTCCCGAGACGAAGACGGGCACTGCCAGCGGGGCACTGTGCTGGACCTGGCAGCA 1135
          G CCAGACGAAGACGGGCACTGCCAGCGGGGCACTGTGCTGGACCTGGCAGCA
Sbjct:  23020 GTGATCCAGACGAAGACGGGCACTGCCAGCGGGGCACTGTGCTGGACCTGGCAGCA 23079

Query:   1136 ACGACTGGCCACCTGGACGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCGTG 1195
          ACGACTGGCCACCTGGACGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCGTG
Sbjct:  23080 ACGACTGGCCACCTGGACGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCGTG 23139

Query:   1196 CCGTGGCAAGTCTGCTACGGCTACTGCAATGACCTGCTGGAAGCGGCTGGCGGAGACA 1255
          CCGTGGCAAGTCTGCTACGGCTACTGCAATGACCTGCTGGAAGCGGCTGGCGGAGACA
Sbjct:  23140 CCGTGGCAAGTCTGCTACGGCTACTGCAATGACCTGCTGGAAGCGGCTGGCGGAGACA 23199

Query:   1256 CGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACTCTGCGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACG 1315
          CGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACTCTGCGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACG
Sbjct:  23200 CGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACTCTGCGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACG 23259

Query:   1316 CGCGCTGAGCGGCTGCTGGGACCTGCTGGCGGCGCGGGCCACATGGCGGTACCA 1375
          GCAGCTGAGCGGCTGCTGGGACCTGCTGGCGGCGCGGGCCACATGGCGGTACCA
Sbjct:  23260 GCAGCTGAGCGGCTGCTGGGACCTGCTGGCGGCGCGGGCCACATGGCGGTACCA 23319

Query:   1376 GCTTCAGTATCAACTCCGCCCGCTCACAGGTGGTGGACTTCAACGAGCCCTTCTCTCCA 1435
          GCTTCAGTATCAACTCCGCCCGCTCACAGGTGGTGGACTTCAACGAGCCCTTCTCTCCA
Sbjct:  23320 GCTTCAGTATCAACTCCGCCCGCTCACAGGTGGTGGACTTCAACGAGCCCTTCTCTCCA 23379

Query:   1436 CCAGCTGGGCAATATGGTGGGGCACGGGACACGGGCTCACCCTACGGTGGCTTTATGT 1495
          CCAGCTGGGCAATATGGTGGGGCACGGGACACGGGCTCACCCTACGGTGGCTTTATGT
Sbjct:  23380 CCAGCTGGGCAATATGGTGGGGCACGGGACACGGGCTCACCCTACGGTGGCTTTATGT 23439

Query:   1496 GGCCTTGCACTGGTCCAGTGGCTGGGCTCTTTGCGGCGCTGACCTCAGCGGCTCT 1555
          GGCCTTGCACTGGTCCAGTGGCTGGGCTCTTTGCGGCGCTGACCTCAGCGGCTCT
  
```

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 9 Continued

Sbjct: 23440 GGCCCCGCACTGGTCCACGTGGCTGGGCGTCTTTGGGGCCCTGCACCTCACCGGCTCT 23499

Query: 1556 TCCTCACCGGTGTACGAGTGGCGTAGCCCCCTACGGCCCTCAGGCCACGTGGCCGCAACCGCA 1615
TCCTCACCGGTGTACGAGTGGCGTAGCCCCCTACGGCCCTCAGGCCACGTGGCCGCAACCGCA

Sbjct: 23500 TCCTCACCGGTGTACGAGTGGCGTAGCCCCCTACGGCCCTCAGGCCACGTGGCCGCAACCGCA 23559

Query: 1616 GCACCGTCTTCTCTACTCTCTCAGCCCTCAACCTGTGCTACGCCATCTCTTCAGACGCA 1675
GCACCGTCTTCTCTACTCTCTCAGCCCTCAACCTGTGCTACGCCATCTCTTCAGACGCA

Sbjct: 23560 GCACCGTCTTCTCTACTCTCTCAGCCCTCAACCTGTGCTACGCCATCTCTTCAGACGCA 23619

Query: 1676 CCGTGTCCAGCAAGACGCCCAAGTGCCCCACGGGCGGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCA 1735
CCGTGTCCAGCAAGACGCCCAAGTGCCCCACGGGCGGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCA

Sbjct: 23620 CCGTGTCCAGCAAGACGCCCAAGTGCCCCACGGGCGGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCA 23679

Query: 1736 TCTTCTGCTGCTGGTGTGCTCCAGCTACACGGCCAACTGGCTGCCGTATGGTCGGGG 1795
TCTTCTGCTGCTGGTGTGCTCCAGCTACACGGCCAACTGGCTGCCGTATGGTCGGGG

Sbjct: 23680 TCTTCTGCTGCTGGTGTGCTCCAGCTACACGGCCAACTGGCTGCCGTATGGTCGGGG 23739

Query: 1796 ACAAGACCTTCGAGGAGCTGTTCGGGATCCAGGACCCCAAGGGCTTCGCTTCGGGACCG 1855
ACAAGACCTTCGAGGAGCTGTTCGGGATCCAGGACCCCAAGG C GC TGG

Sbjct: 23740 ACAAGACCTTCGAGGAGCTGTTCGGGATCCAGGACCCCAAGG C GC TGG 23799

Query: 1856 TGTGGGAG 1863
TG GGG G

Sbjct: 23800 TGGGGGTG 23807

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 10

Score = 2426 (854.0 bits), Expect = 0.0, Sum P(2) = 0.0
Identities = 463/474 (97%), Positives = 464/474 (97%), Frame = +1

Query: 1063 KVTGSSPPEDGQCFAQQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCIDLLER 1242
+V FDEDSQCFAQQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCIDLLER
Sbjct: 427 FVFARDPDEDSQCFAQQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCIDLLER 486

Query: 1243 LAEDTPFDFFELTVLVDGKYGALRDGRWTCLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS 1422
LAEDTPFDFFELTVLVDGKYGALRDGRWTCLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS
Sbjct: 487 LAEDTPFDFFELTVLVDGKYGALRDGRWTCLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS 546

Query: 1423 FFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMWPLHWSWLGVFALHLTALFLTVYENRSPYGLTPR 1602
FFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMWPLHWSWLGVFALHLTALFLTVYENRSPYGLTPR
Sbjct: 547 FFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMWPLHWSWLGVFALHLTALFLTVYENRSPYGLTPR 606

Query: 1603 GRNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCPTRGLLMNLWALFCLLVLSSTANLAA 1782
GRNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCPTRGLLMNLWALFCLLVLSSTANLAA
Sbjct: 607 GRNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCPTRGLLMNLWALFCLLVLSSTANLAA 666

Query: 1783 VMVGDKTFEELSGIHDPK-----GFRFGTVWESSAEAYIKKSFDDMHAMRRHSAPTTP 1944
VMVGDKTFEELSGIHDPK GFRFGTVWESSAEAYIKKSFDDMHAMRRHSAPTTP
Sbjct: 667 VMVGDKTFEELSGIHDPKLGHPAQGFRTVWESSAEAYIKKSFDDMHAMRRHSAPTTP 726

Query: 1945 RGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN 2124
RGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN
Sbjct: 727 RGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN 786

Query: 2125 LSEFISRYKSSGFIDLHDKWYKMPGKRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL 2304
LSEFISRYKSSGFIDLHDKWYKMPGKRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL
Sbjct: 787 LSEFISRYKSSGFIDLHDKWYKMPGKRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL 846

Query: 2305 LSSLGEHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRLNTEPPFGSKEETAEEAP 2466
LSSLGEHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRLNTEPPFGSKEETAEEAP
Sbjct: 847 LSSLGEHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRLNTEPPFGSKEETAEEAP 900

[illegible]

CACGATTTTGTGCGGGCGCTGTGGCTGGGCTTGGCCTGGCGCTGGGGCGGGGGTCCGCGGGGGCG
 CAAGCTCAGCGGTCGCGGCTCTTGGCGCGCGCTCGGGGCGCTCGGTGGCGCTGGGGCGGCTCTGCGCC
 GCGGGCTGTGCGCCCGCGCCCGCGCGCGCGCGCTGGCGCGGGCGGCTGGCGCGCGGGCTGGC
 GCACAACTTGAGCTTGGAGAGCTGTTGTTCGGCGCGGCTCCCCCGCGCGACCGCCCGCTGTGACAGCCG
 CGCTGTGCCAGGCGCTGGTGCGTCTCGGGCGTGGGGCGGCTGCTGCGCTTCCGAGGCTCGCGCGG
 AGCTGTGCAAGCTGCATCTTCCGGCGGGCGGCCACGAGAACCCTGTGCTGACGCTGCTGCGGCGGG
 AGGGCGCGCGCGCTCGAGCGCGCGAACCATTCCACTGCAAGTGCATGGGGCGAGGCTGCGGCTGTG
 AGACGCTGTGCTGATGTCTGTGTGGCGTGTGACGAGGCGACGCTGGGAAGAGCTCGCGCTGGCGT
 TTGGCGCATCAGGACACCGCGGCGCTGTGGGCTCTGGAGACGCGGCTGGCGCGGCGCCAC
 AGCTGTGTCTGACCATAGCGCGGGGACAGCGGAGTGCAGGAGTCTGGGCGACGCTGGCGCGCGA
 TGGCGCGCGAATGGGGGTGTGAACGACCGTACCGCGAGGCGTCTCTCGCTGTGACATGCGCC
 TCGCCCTCGGGTGTCTGGAGGCGCTACTCCCGCGGCCCACTGGCTGTGTGGGACAGGACATCGCCG
 CAAGGCGCTGCCACCGCGGGGCTGCCAACGGCTGCTGGCGCTGGGCGAGGTGCACACGACACCCG
 GTGGAAGGCGAGCTCCATGACATTTGCAACTGTGGCGCGCGGCGCTGGGCAGTGCGCGCCAGGT
 CCGACCGAAGCGAGGCTCTCCCGCGCCGCTGAAGTCTGGGGGACCTCGACGCGCGCGCGCGCGA
 GTCCCGGGGCGCTTCTTGCGACGGTGTCTCGGCAACAACGCTCTTCCAGGGCGCGACGGGCGCGT
 TGGGTGACAGGACGACTGCCAGCAAGAGCGGCACTGCCGAGCGGGGACGCTGTGCGCTGGAACCT
 GGCAACAAGACTCTGGCCACGCTGGACGCACTTTGGCGCGCTGGGCGACGCTGAGCGCGCGCT
 GCGCTCGCAAGTGCTACTACGCTACTGCACTGCACTGTGGAGCGGCTGGGGAGGACACGCCC
 TTGCACTCGAGCTGTACTCTGGTGTGAGCGGCAATGACGGCGCTCGGGAGCGGCGCTGAGAC
 GCGCTGTGTGCGGACCTGTGTGGCGCGCGGGCCACATGGCGTGCACCAAGTTCAGTATCAACTCC
 SCGCGCTCAAGGTGTGTGACTTACCAAGCGCTTTCTTCCACAGGCTGGGCACTGTGTGTGGG
 ACGGGACACGCGCTACCCATCGGTGCTTTATGTGGCGCTGCACTGTGCAAGCTGTGGGCT
 TTTGGGCGCTCGACCTACCGGCTCTTCTCAAGTGTACAGAGTGGGTAGCGCTACGGCTC
 ACGCCAGCTGGGCGCAACCGGACACCGTCTTCTCACTGCTACGCGCTCAACCTGTGTGTAACCT
 TCTTTCAGACGACCGTGTCCAGCAAGGCTTCTAGTGGCGCCACGGGCGCTGCTCATGAACCT
 TTGGGCACTTCTCGGCTGTGTGCTGTCCAGTACACCGCAACCTGCGTGGCTGCGGTCAATGTCGGT

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 13

MEFVRALWGLALALGPGSAGGHPQPCGVILRLGGSVRLGALLPRAPLARARARAALARAALAPRLPH
NLSELELVAAAPPARDPASLTRLGCLQALVPPGVAALLAFPEARPELLQLHFLAAATETPVLISLRREARAP
LGAPNPHILQLHWAASPLETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCRTQDPGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLS
RRDTGDAGLRARLAPMAAPVGGEAPVPAAVLLGCDIARARRVLEAVPPGPHWLLGTPLPPKALPTAGLP
POLLALQEVARPPLEAAIHDIQVLVARALGSAQVQPKRALLPAPVNCGLQAPAGPESPGRFLARFLANT
SFQGRTPGVWVTGSSPDEDGQCPAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCIDLLER
LAEDTPEDFELYLVGDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSPINSARSQVVDFTSPFFSTSLGI
MVRARDTASPIGAFMWPLHWSTWLGVPALHLTALFLTVYEWRSFYOLTFRGRNRSTVFSYSSALNLC
YAILFRRTVSSKTPKCTGRLLMNLWAFCLLVSSYTANLAAMVMDKTFEELSGIHDPKLHHPAQQFR
FGTVWESSAEAYIKKSFPMHMHMRHSAPTTPRGVAMLTSDPPKLNATMDKSLLDYEVSIDADCKLL
TVGKFAIEGYGIGLPQNSPLTSLNLSFISRYKSSGFIDLLHDKWYKIMVPCGKRVFVAVTETLQMSIYHFAG
LFVLLCLGLGSALLSSLGEHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRALNTEPPGSKETAEAEPSGPE
VEQQQQQQDQPTAPEGWKRARRAVDKERRVRLLPEAVVVAPEADAEAAAPREGPVWLCSYGRPPA
ARFTGAPOQGELOELERRIEVARERLRQALVRRGQLLAQLGDSARHRPRLLQARAAPAEAPPHSGRPGS
QE

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 14

Score = 3832 (575.0 bits), Expect = 0.0, Sum P(3) = 0.0

Identities = 948/1107 (85%), Positives = 948/1107 (85%), Strand = Plus / Plus

Query: 788 CACTGCGCCCAAGGCCCTGCCACCGCGGGGCTGCCACCAAGGCTGCTGGCGCTGGGCG 847
C CTGCC CC A G CCTG CCA C CG CT CCA GC C GGC C G G G
Sbjct: 22736 CCTTGGC-CCTAGGTTCTTGGCCAACACGTC-CTTCCAGGGCGCA-CGGGCCCGCTGTG 22792

Query: 848 AGGTGGCAGG-ACCCCCGCTGG-AGGCC-G-C-CATC-CATGACATTGTGCACTGGTGG 901
GGTG CA G A C CC C CG A C G C C C C T A TGTG A C T G
Sbjct: 22793 -GGTGACAGGCAGCTCC-CAGGTACACATGTCCTGGCACTTTAAGGTGTGGAGCCT-TCG 22849

Query: 902 CCGGGCCGCT-GGGCAGTGGGGCCAGGTGCAGCCGAAGCGAGCCCTCTCCCGGCCCCG 960
CC GG C C GGG G C G CC GG CA C G G AGC C C GCC G
Sbjct: 22850 CCGGGAACCAACGGGGCGCCCCGGCTGGGCCA-CGGTGGGCACTGGCGGAGCGGCA-G 22907

Query: 961 GTCAACTGCGGGGACCTGCAGCCGCGGGGCCGAGTCCCGGGGCG-CTTCTTGGCAG 1019
T ACT GG ACC G AG G C GC CG G CCCC C C TG C G
Sbjct: 22908 CTGGACTT--GGAACCGGGAGGTGCTCTGCAG-GCCCCGCCCCCACAGGGTGCCTAG 22964

Query: 1020 GTTCCTGCCC-AA-CA-CGTCTTCCAGGCCCAAGGGC-CCCGTGTGGGTGACAGCA 1075
GT CTGGCC AA C CGT T A GC G G C CCC T TG GT G C
Sbjct: 22965 GT--CTGGCCCAAGCTGCGTG-TGGTAACGCTGTTGCAACACCCATTGTGTTT--GCCC 23019

Query: 1076 GCTCCCGAGACGAAGACGGGAGTGCAGGCCAGGGGGCAGCTGTGCTGGACCCCTGGCACCA 1135
G CAGACGAAGACGGGAGTGCAGGCCAGGGGGCAGCTGTGCTGGACCCCTGGCACCA
Sbjct: 23020 GTGATCCAGACGAAGACGGGAGTGCAGGCCAGGGGGCAGCTGTGCTGGACCCCTGGCACCA 23079

Query: 1136 ACGACTGGGCCACCCCTGGAGCGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAACGGCTCAGCGCCCGT 1195
ACGACTGGGCCACCCCTGGAGCGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAACGGCTCAGCGCCCGT
Sbjct: 23080 ACGACTGGGCCACCCCTGGAGCGCACTGTTCGCCGCGCTGGCCAAACGGCTCAGCGCCCGT 23139

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 14 Continued

Query: 1196 CCTGCGCAAGTGTCTACGGCTACTGCAATGACCTGCTGGAGCGGCTGGCGGAGACA 1255
 Sbjct: 23140 CCTGCGCAAGTGTCTACGGCTACTGCAATGACCTGCTGGAGCGGCTGGCGGAGACA 23199

Query: 1256 CCCCCCTCGACTTCGAGCTGTACCTCGTGGGTGACGGCAAGTACGGCGGCTTCGGGAGC 1315
 Sbjct: 23200 CCCCCCTCGACTTCGAGCTGTACCTCGTGGGTGACGGCAAGTACGGCGGCTTCGGGAGC 23259

Query: 1316 GCGGCTGGACCGGCTGGTGGGGACCTGCTGGCCGGCCGGGCCACATGGCGGTACCA 1375
 Sbjct: 23260 GCGGCTGGACCGGCTGGTGGGGACCTGCTGGCCGGCCGGGCCACATGGCGGTACCA 23319

Query: 1376 GCTTCAGTATCAACTCCGCCGCTCAGGTGGTGGACTTCACGAGCCCTTCTTCTCA 1435
 Sbjct: 23320 GCTTCAGTATCAACTCCGCCGCTCAGGTGGTGGACTTCACGAGCCCTTCTTCTCA 23379

Query: 1436 CCAGGCTGGGATCATGGTGGGACAGGACACGGGCTACCCATCGGTGCTTTATGT 1495
 Sbjct: 23380 CCAGGCTGGGATCATGGTGGGACAGGACACGGGCTACCCATCGGTGCTTTATGT 23439

Query: 1496 GGGCCCTGCACGTGTCCACGTGGCTGGGCGTCTTTGGGGCTTGCACCTACCGCGCTCT 1555
 Sbjct: 23440 GGGCCCTGCACGTGTCCACGTGGCTGGGCGTCTTTGGGGCTTGCACCTACCGCGCTCT 23499

Query: 1556 TCCTCACCCTGTACGAGTGGCGTACGCCCTAAGGCTCAGGCCAGTGGCGGCAACCGCA 1615
 Sbjct: 23500 TCCTCACCCTGTACGAGTGGCGTACGCCCTAAGGCTCAGGCCAGTGGCGGCAACCGCA 23559

Query: 1616 GCACCGCTTCTCTCTACTCTCAGCCCTCAACCTGTGTACGCCATCTCTTTCAGAGCA 1675
 Sbjct: 23560 GCACCGCTTCTCTCTACTCTCAGCCCTCAACCTGTGTACGCCATCTCTTTCAGAGCA 23619

Query: 1676 CCGTGTCCAGCAAGACGCCCAAGTGGCCCAAGGCGGCGGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCA 1735
 Sbjct: 23620 CCGTGTCCAGCAAGACGCCCAAGTGGCCCAAGGCGGCGGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCA 23679

Query: 1736 TCTTCTGCTGCTGTGTGTGTTCAGCTACACGGGCAACCTGGCTGCGGTCAATGCTCGGG 1795
 Sbjct: 23680 TCTTCTGCTGCTGTGTGTGTTCAGCTACACGGGCAACCTGGCTGCGGTCAATGCTCGGG 23739

Query: 1796 ACAAGACCTTCGAGGAGCTGTCTGCGGATCCAGACCCCAAGCTGCACACG-CGGCGCAG 1854
 Sbjct: 23740 ACAAGACCTTCGAGGAGCTGTCTGCGGATCCAGACCCCAAGCTGCACACG--G 23796

Query: 1855 GGCCTCCGCTTCGGCACCGTGTGGGAGACAGG-CGAGG 1894
 Sbjct: 23797 GGCCTCCGCTTCGGCACCGTGTGGGAGACAGG--G 23834

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 15

Score = 2481 (873.4 bits), Expect = 0.0, Sum P(2) = 0.0

Identities = 469/474 (98%), Positives = 470/474 (99%), Frame = +1

```

Query: 1063 WVTGSSPDEDGQCPAGQLCLDPGTND SATLDALFAALANGSAPRALRKC CYCIDLLER 1242
          +V PDEDGQCPAGQLCLDPGTND SATLDALFAALANGSAPRALRKC CYCIDLLER
Sbjct: 427 FVFARDPDEDGQCPAGQLCLDPGTND SATLDALFAALANGSAPRALRKC CYCIDLLER 486

Query: 1243 LAEDTFFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS 1422
          LAEDTFFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS
Sbjct: 487 LAEDTFFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTS 546

Query: 1423 PFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMNP LHNSTWLGVFALHLTALFLTVEWRSPLYGLTFR 1602
          PFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMNP LHNSTWLGVFALHLTALFLTVEWRSPLYGLTFR
Sbjct: 547 PFFSTSLGIMVRARDTASPIGAFMNP LHNSTWLGVFALHLTALFLTVEWRSPLYGLTFR 606

Query: 1603 GNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCP TGRLLMNLWAI PCLLVLSSTYANLAA 1782
          GNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCP TGRLLMNLWAI PCLLVLSSTYANLAA
Sbjct: 607 GNRSTVFSYSSALNLCYAILFRRTVSSKTFKCP TGRLLMNLWAI PCLLVLSSTYANLAA 666

Query: 1783 VMVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQCFRFGTVWESSAEAYIKKSF PDMHAMRRHSAPTTP 1962
          VMVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQCFRFGTVWESSAEAYIKKSF PDMHAMRRHSAPTTP
Sbjct: 667 VMVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQCFRFGTVWESSAEAYIKKSF PDMHAMRRHSAPTTP 726

Query: 1963 RGVAMLTS DPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN 2142
          RGVAMLTS DPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN
Sbjct: 727 RGVAMLTS DPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPAIEGYGIGLPQNSPLTSN 786

Query: 2143 LSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPFCGRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL 2322
          LSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPFCGRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL
Sbjct: 787 LSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPFCGRVFAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCLGLGSAL 846

Query: 2323 LSSLGEHAFFRLALFRIRKGSRLQYWLHTSQXIHRLNTEFPFGSKEETAERAP 2484
          LSSLGEHAFFRLALFRIRKGSRLQYWLHTSQXIHRLNTEFPFGSKEETAERAP
Sbjct: 847 LSSLGEHAFFRLALFRIRKGSRLQYWLHTSQXIHRLNTEFPFGSKEETAERAP 900

```

PCT/US00/33909

FIG. 16

[illegible]

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 17

ATGGAGTTTGTGCGGGCGCTGTGGCTGGGCTGGCGCTGGCGCTGGGGCCGGGTCGGCGGGGGC
 CACCTTCAGCGGTGCGGGTCTGGCGCGCTCGGGGGCTCCGTGCGCTGGGCGCTCTCTGCCCC
 GCGCGCTCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGCGGGGGCGCTGGCGCGCGCGCTGGC
 GCACAACCTGAGCTTGGAGCTGGTGGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGGCTGACCCG
 GGCTGTGCGAGCGCGCTGGTGGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGCTGTGCGAGCTGCACTTCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGGCGCGCGCGCGCGCTGGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGACCGCTGTGGATGTGTGGTGGCGCGCTGGTGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TGTGCGCGCACTCAGGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGCTGTCTGGACCTAAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TGGCGCGCGCGCGCTGGGGGGTGAAGCACCGGTACCGCGCGCGCTGGCTGTGGGACCGCGCGCG
 GTGCGCGCTGGGCTGTGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CAAGGCGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCTGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCAGCGGAAGCGAGCGCTCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GTGCGCGCGCGCGCTCTTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TGGGTGACAGCGCGCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CACGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GAGGTGCGCTGTGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CGCTGTGGAACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGCTGTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CGCGTACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCGGAGGACACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TTCAGTATCACTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCATCATGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CACGTGGCTGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGCGCGCTACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACCTGTGTACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CCGTGTGTGAACTCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCGGTATGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 TTCCCGGACATGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CTCACGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CCATGACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GACTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 CTTTATGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACAGAGACCGTGCAGATGAGCATCTACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCAGCGCTCTGTGAGCTGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACCAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
 GAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GAGGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 ACGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GCTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
 GAGCCAGGAATGA

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 18

MEFVRALWGLALALGPGSAGGHFQPCGVLARLGGSVRLGALLPRAPLARARARAALARAALAPRLPH
NLSLELVVAAPPARDPASLTRGLCQALVPPGVAALLAPPEARPELLQLHFLAAATETPVLSSLRREARAP
LGAPNPFHLQLHWASPIETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCRTQDPGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLS
RRTGDAGLARLARLAPMAAPVCGEAPVPAAVLLGCDIARARRVLEAVPPQPHWLLGTPLPPKALFTAGLP
PGLLALGEVARPFLBAAIHDIVQLVARALGSAAQVQPKRALLPAPVNCODLQAPGEPSPGRFLARFLANT
SFQGRTGFEVWVTGSSQVHMSRHEKVWVSLRRDPRGAPAWATVGSWRDQQLDEFGGASARPPPPQGAQ
VWPKL RVVTLLEHPVFARDPDEDGQCPAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYCI
DILLERLAEDTPDFELYLVGDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQVVDFTSPFFS
TSLGIMVRARDTASPIGAFMWPLHWSTWLG VFAALHLTALFLT VYEWRSYGLTPGRNRSTVFSYSSA
LNL CYAILFRRTVSSKTPKCTPTGRLLMNLWAFCLLVLSY TANLAAMVMVDKTFEELSGIHDPKLHHPA
QGFRPGTVWESSAEAYIKKSFDMHAHMRHSAPTTPRGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDAD
CKLLTVGKFFAIEGYGIGLPQNSPLTSNLSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKMPVPCGKRVFAVTEILQMSY
HFAGLFVLLCLGLGSALLSSLGEHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQIHRALNTEPPGSKETAEAEF
SGPEVEQQQQQDQPTAPEGWKRARRAVDKERRVRFLLEPAVVVAPEADAEAEAAAPREGPVWLC SYG
RPF AARPTGAPQPGELQELERRIEVARERLRQALVRRGQLLAQLCHDSARHRPRRLQARAAPAEAPPHSG
RPGSQE

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 19

Score = 5188 (778.4 bits), Expect = 0.0, Sum P(4) = 0.0

Identities = 1068/1092 (97%), Positives = 1068/1092 (97%), Strand = Plus / Plus

Query: 1019 GGTTCCTGGCCAAACACGTCCTTCCAGGGCCGACAGGGCCCCGTGTGGGTGACAGGCAGCT 1078
 GGTTCCTGGCCAAACACGTCCTTCCAGGGCCGACAGGGCCCCGTGTGGGTGACAGGCAGCT

Sbjct: 22747 GGTTCCTGGCCAAACACGTCCTTCCAGGGCCGACAGGGCCCCGTGTGGGTGACAGGCAGCT 22806

Query: 1079 CCCAGGTACACATGTCCTCGGCACCTTTAAGGTGTGGAAGCCTTCGCCGGGACCCACGGGCG 1138
 CCCAGGTACACATGTCCTCGGCACCTTTAAGGTGTGGAAGCCTTCGCCGGGACCCACGGGCG

Sbjct: 22807 CCCAGGTACACATGTCCTCGGCACCTTTAAGGTGTGGAAGCCTTCGCCGGGACCCACGGGCG 22866

Query: 1139 CCCCAGGCTGGGCCACGGTGGGCAGCTGGCGGGACGSCCAGCTGGACTTGGAAACCGGAG 1198
 CCCCAGGCTGGGCCACGGTGGGCAGCTGGCGGGACGSCCAGCTGGACTTGGAAACCGGAG

Sbjct: 22867 CCCCAGGCTGGGCCACGGTGGGCAGCTGGCGGGACGSCCAGCTGGACTTGGAAACCGGAG 22926

Query: 1199 GTGCCTCTGCACGGCCCCCGCCCCACAGGGTGCCTGAGCTGAGCCCAAGCTGCGTGTGG 1258
 GTGCCTCTGCACGGCCCCCGCCCCACAGGGTGCCTGAGCTGAGCCCAAGCTGCGTGTGG

Sbjct: 22927 GTGCCTCTGCACGGCCCCCGCCCCACAGGGTGCCTGAGCTGAGCCCAAGCTGCGTGTGG 22986

Query: 1259 TAAAGCTGTGGGAACACCCATTGTGTGTTGCCCGTGATCCAGACGAAGACGGGCAGTGCC 1318
 TAAAGCTGTGGGAACACCCATTGTGTGTTGCCCGTGATCCAGACGAAGACGGGCAGTGCC

Sbjct: 22987 TAAAGCTGTGGGAACACCCATTGTGTGTTGCCCGTGATCCAGACGAAGACGGGCAGTGCC 23046

Query: 1319 CAGCGGGCAGCTGTGCTGGACCTTGGACCAACGACTCGGCCACCCCTGGACGCACTGT 1378
 CAGCGGGCAGCTGTGCTGGACCTTGGACCAACGACTCGGCCACCCCTGGACGCACTGT

Sbjct: 23047 CAGCGGGCAGCTGTGCTGGACCTTGGACCAACGACTCGGCCACCCCTGGACGCACTGT 23106

Query: 1379 TCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCCGTGCTGCGCAAGTGTGCTACGGCTACT 1438
 TCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCCGTGCTGCGCAAGTGTGCTACGGCTACT

Sbjct: 23107 TCGCCGCGCTGGCCAAAGGCTCAGCGCCCCGTGCTGCGCAAGTGTGCTACGGCTACT 23166

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 19 Continued

Query: 1439 GCATTGACCTGCTGGAGCGGCTGGCGGAGGACAGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACCTCG 1498
 GCATTGACCTGCTGGAGCGGCTGGCGGAGGACAGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACCTCG
 Sbjct: 23167 GCATTGACCTGCTGGAGCGGCTGGCGGAGGACAGCCCTTCGACTTCGAGCTGTACCTCG 23226

Query: 1499 TGGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACGGCCGCTGGACCGGCTGGTCGGGGACC 1558
 TGGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACGGCCGCTGGACCGGCTGGTCGGGGACC
 Sbjct: 23227 TGGGTGACGGCAAGTACGGCGCCCTGCGGGACGGCCGCTGGACCGGCTGGTCGGGGACC 23286

Query: 1559 TGC TGGCCGGCTGGGCCCCACATGGCGGTACACAGCTTCAGTATCAACTCCGCCGCTCAC 1618
 TGC TGGCCGGCTGGGCCCCACATGGCGGTACACAGCTTCAGTATCAACTCCGCCGCTCAC
 Sbjct: 23287 TGC TGGCCGGCTGGGCCCCACATGGCGGTACACAGCTTCAGTATCAACTCCGCCGCTCAC 23346

Query: 1619 AGGTGGTGGACTTCACACGCCCTTCTTCTCCACAGCTGGGCAATCATGGTGGGGCAC 1678
 AGGTGGTGGACTTCACACGCCCTTCTTCTCCACAGCTGGGCAATCATGGTGGGGCAC
 Sbjct: 23347 AGGTGGTGGACTTCACACGCCCTTCTTCTCCACAGCTGGGCAATCATGGTGGGGCAC 23406

Query: 1679 GGGACACGGGCTCACCCATCGGTGCTTTATGTGGGCCCTGCAC TGGTCCAGTGGCTGG 1738
 GGGACACGGGCTCACCCATCGGTGCTTTATGTGGGCCCTGCAC TGGTCCAGTGGCTGG
 Sbjct: 23407 GGGACACGGGCTCACCCATCGGTGCTTTATGTGGGCCCTGCAC TGGTCCAGTGGCTGG 23466

Query: 1739 GCGTCTTTTGGGCCCTGCAACCTCACCGGCTCTTCTCTACCGTGTACGAGTGGGTAGCC 1798
 GCGTCTTTTGGGCCCTGCAACCTCACCGGCTCTTCTCTACCGTGTACGAGTGGGTAGCC
 Sbjct: 23467 GCGTCTTTTGGGCCCTGCAACCTCACCGGCTCTTCTCTACCGTGTACGAGTGGGTAGCC 23526

Query: 1799 CCTACGGCTTCACGCCACGTGGCCGCAACCGCAGCACCTTCTTCTCTACTCTCAGCCC 1858
 CCTACGGCTTCACGCCACGTGGCCGCAACCGCAGCACCTTCTTCTCTACTCTCAGCCC
 Sbjct: 23527 CCTACGGCTTCACGCCACGTGGCCGCAACCGCAGCACCTTCTTCTCTACTCTCAGCCC 23586

Query: 1859 TCAACCTGTGCTACGCCATCCTCTTCAGACGCAACGCTGCCAGCAAGACGCCCAAGTGCC 1918
 TCAACCTGTGCTACGCCATCCTCTTCAGACGCAACGCTGCCAGCAAGACGCCCAAGTGCC
 Sbjct: 23587 TCAACCTGTGCTACGCCATCCTCTTCAGACGCAACGCTGCCAGCAAGACGCCCAAGTGCC 23646

Query: 1919 CCACGGGCCGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCATCTTCTGCGCTGCTGGTGTGTCAGCT 1978
 CCACGGGCCGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCATCTTCTGCGCTGCTGGTGTGTCAGCT
 Sbjct: 23647 CCACGGGCCGCTGCTCATGAACCTCTGGGCCATCTTCTGCGCTGCTGGTGTGTCAGCT 23706

Query: 1979 ACACGGCCAACTGGCTGCGCTCATGGTGGGGACAAGACCTTCGAGGAGCTGTGGGGA 2038
 ACACGGCCAACTGGCTGCGCTCATGGTGGGGACAAGACCTTCGAGGAGCTGTGGGGA
 Sbjct: 23707 ACACGGCCAACTGGCTGCGCTCATGGTGGGGACAAGACCTTCGAGGAGCTGTGGGGA 23766

Query: 2039 TCCACGACCCCAAGTGCACCAAC-CGGCGCAGGGCTTCCGCTTCGGCACCGTGTGGGAG 2097
 TCCACGACCCCAAG TG C CC CG G GGGCT C G T GGC G G GGG
 Sbjct: 23767 TCCACGACCCCAAGGTGGGGCGGCTCGG-G--GGGCTGGGGT--GGGCTGGG-GGGCT 23820

Query: 2098 AGCAGCG-CCGAGG 2110
 AGC G G CC GG
 Sbjct: 23821 AGCGGTGGCCCGG 23834

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 20

Score = 4730 (1665.0 bits), Expect = 0.0, P = 0.0
 Identities = 900/900 (100%), Positives = 900/900 (100%), Frame = +1

Query: 1 MEFVRALMLGLALALGPGSAGGHFQPCGVLARLGGSVRLGALLPRAFLARARARAALARA 180
 MEFVRALMLGLALALGPGSAGGHFQPCGVLARLGGSVRLGALLPRAFLARARARAALARA
 Sbjct: 1 MEFVRALMLGLALALGPGSAGGHFQPCGVLARLGGSVRLGALLPRAFLARARARAALARA 60

Query: 181 ALAPRLPHNLSEELVVAAPFARDPASLIRGLCQALVFPVGVALLAFPEARPELLQLHFLA 360
 ALAPRLPHNLSEELVVAAPFARDPASLIRGLCQALVFPVGVALLAFPEARPELLQLHFLA
 Sbjct: 61 ALAPRLPHNLSEELVVAAPFARDPASLIRGLCQALVFPVGVALLAFPEARPELLQLHFLA 120

Query: 361 AATETPVLSLLRREARAPLGAPNPFHLQLHWASPLETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCR 540
 AATETPVLSLLRREARAPLGAPNPFHLQLHWASPLETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCR
 Sbjct: 121 AATETPVLSLLRREARAPLGAPNPFHLQLHWASPLETLLDVLVAVLQAHAWEDVGLALCR 180

Query: 541 TQDPGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRRDTGDAGLRARLAPMAAPVGGAPVPAVLLGC 720
 TQDPGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRRDTGDAGLRARLAPMAAPVGGAPVPAVLLGC
 Sbjct: 181 TQDPGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRRDTGDAGLRARLAPMAAPVGGAPVPAVLLGC 240

Query: 721 DIARARRVLEAVFPGFHWLLGTPLPKALPTAGLPPGLLALGEVARPPLEAAIHDIQVLV 900
 DIARARRVLEAVFPGFHWLLGTPLPKALPTAGLPPGLLALGEVARPPLEAAIHDIQVLV
 Sbjct: 241 DIARARRVLEAVFPGFHWLLGTPLPKALPTAGLPPGLLALGEVARPPLEAAIHDIQVLV 300

Query: 901 ARALGSAQVQPKRALLPAPVNCGLQFAGPESFGRFLARFLANTSFQGRITGFVWVTGSS 1080
 ARALGSAQVQPKRALLPAPVNCGLQFAGPESFGRFLARFLANTSFQGRITGFVWVTGSS
 Sbjct: 301 ARALGSAQVQPKRALLPAPVNCGLQFAGPESFGRFLARFLANTSFQGRITGFVWVTGSS 360

Query: 1081 QVHMSRHFKVWSLRDRPRGAPAMATVGSWRDQQLDLEPGASARPPPPQGAQVWPKLRVV 1260
 QVHMSRHFKVWSLRDRPRGAPAMATVGSWRDQQLDLEPGASARPPPPQGAQVWPKLRVV
 Sbjct: 361 QVHMSRHFKVWSLRDRPRGAPAMATVGSWRDQQLDLEPGASARPPPPQGAQVWPKLRVV 420

Query: 1261 TLLHFPFVFARDPDEDGQCQAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYC 1440
 TLLHFPFVFARDPDEDGQCQAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYC
 Sbjct: 421 TLLHFPFVFARDPDEDGQCQAGQLCLDPGTNDSATLDALFAALANGSAPRALRKCCYGYC 480

Query: 1441 IDLLERLAEDTFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQ 1620
 IDLLERLAEDTFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQ
 Sbjct: 481 IDLLERLAEDTFDFELYLVDGKYGALRDGRWTGLVGDLLAGRAHMAVTSFSINSARSQ 540

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 20 Continued

Query: 1621 VVDFTSEFFSTSLGINVRARDTASPIGAFHNPFLHSTWLGVPFALHLTALFLTVEWRSP 1800
 VVDFTSEFFSTSLGINVRARDTASPIGAFHNPFLHSTWLGVPFALHLTALFLTVEWRSP
 Sbjct: 541 VVDFTSEFFSTSLGINVRARDTASPIGAFHNPFLHSTWLGVPFALHLTALFLTVEWRSP 600

Query: 1801 YGLTPRCNRSTVFYSALALCYAILFRRTVSSKTPKCPGRLMNLWAFCLLVLSY 1980
 YGLTPRCNRSTVFYSALALCYAILFRRTVSSKTPKCPGRLMNLWAFCLLVLSY
 Sbjct: 601 YGLTPRCNRSTVFYSALALCYAILFRRTVSSKTPKCPGRLMNLWAFCLLVLSY 660

Query: 1981 TANLAAMVVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQGFRTGVWESSAEAYTKKSPDMHAMMRH 2160
 TANLAAMVVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQGFRTGVWESSAEAYTKKSPDMHAMMRH
 Sbjct: 661 TANLAAMVVGDKTFEELSGIHDPKLHHPAQGFRTGVWESSAEAYTKKSPDMHAMMRH 720

Query: 2161 SAPTTPRGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPFAIEGYGIGLPQN 2340
 SAPTTPRGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPFAIEGYGIGLPQN
 Sbjct: 721 SAPTTPRGVAMLTSDPPKLNAFIMDKSLLDYEVSIDADCKLLTVGKPPFAIEGYGIGLPQN 780

Query: 2341 SPLTSNLSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPCKRKFVAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCL 2520
 SPLTSNLSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPCKRKFVAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCL
 Sbjct: 781 SPLTSNLSEFISRYKSSGFIDLLHDKWYKVPCKRKFVAVTETLQMSIYHFAGLFVLLCL 840

Query: 2521 GLGSALLSSLGHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRALNTEPPEGSKEETAAREP 2700
 GLGSALLSSLGHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRALNTEPPEGSKEETAAREP
 Sbjct: 841 GLGSALLSSLGHAFFRLALPRIRKGSRLQYWLHTSQKIHRALNTEPPEGSKEETAAREP 900

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 21

Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 MRRSLIWLISR TGLHDP CALVLA GVFSSSHDPQQLRPLGHAFFGAGAGLDPWTI
 MEFVRAIWIG TALAALDP OS AGGHDPQCCYLARIQSVRLQALIF
 MEFVRAIWIG TALAALDP OS AGGHDPQCCYLARIQSVRLQALIF
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 APRASRA QEGG TAAQEDD PESGTWRPPAFSGQARWLQSLHGPFPFGSRKLGGAGAG
 AP LARARA RAALAP AALAP
 AP LARARA RAALAP AALAP
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 TLWPRDALLFV EHLNRVEGL T VNLSELEWQLEAQLGDLPLMPFFSSPSPWSSDPLFP
 LPHNLSLELVVAAPP AEDPASE
 LPHNLSLELVVAAPP AEDPASE
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 LOSGCTIYVQVVSATLAFPOSQGERHEDLHSEVLIHIVLSWHEF - PRESONPLH
 TGLCOALVPPGVAAALAFPEARFELLQLHFLAAATETPYLSLREARAPLOADHPFH
 TGLCOALVPPGVAAALAFPEARFELLQLHFLAAATETPYLSLREARAPLOADHPFH
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 TISLENS TSHDAPFUGHITMNNYHFSPLCQEDWNITDFILTHNSKPHLESVNH
 QHHTASPL EILLDVLVAVLQAHAWEDVOLALCRTOQDPOGLVALWTSRAG RPPCLVLDIS
 QHHTASPL EILLDVLVAVLQAHAWEDVOLALCRTOQDPOGLVALWTSRAG RPPCLVLDIS
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 ANIESTEDLSIFQVMDNHR - NSTPILNIFCPEDPSIFQVEMSTQFGSPDILRWVL
 RRDIGDAGLEFARLAPMAAPVGGGAPVPAVLLGCDIARARVLEA VPPDPHML
 RRDIGDAGLEFARLAPMAAPVGGGAPVPAVLLGCDIARARVLEA VPPDPHML
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 FDSQNVETDRLTULIIZALGKTIQSVFYVQDAGELVARAGGATIMHOFILALLST
 GTPLPPKALPTAGLPFOLLALGEVARPPLEAAIHDIQVLVARALGSAAGVCPPEALLPAP
 TPLPPEALPTAGLPFOLLALGEVARPPLEAAIHDIQVLVARALGSAAGVCPPEALLPAP
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 SNCFDQKTYINLHSDQLSRFLANTHFGSLGSHIVKSSHLSSEINFEHMDQDPLK
 VHCGLQPAWESPGRFLARFLANTSFQRTGPPVWVTGSSQVHSEHFWWSLEEDIEGA
 VHCGLQPAWESPGRFLARFLANTSFQRTGPPVWVTGSSQVHSEHFWWSLEEDIEGA
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 PMAVTRGSSWGGRLVNSGIWPEQAQKXTHFOHPNKLHNVVLLSEHFVETLSEVHNSG
 PAWATVGSWEDGGLDLEFG - - - - - SASARPPPPQGAQVWPKLEVVTLEHD FVFAEDIEDG
 PAWATVGSWEDGGLDLEFG - - - - - SASARPPPPQGAQVWPKLEVVTLEHD FVFAEDIEDG
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 LCPAGGLCLDPTINDSMLDELFSHSSNDWPLKFFHCCGVYCIDLLGQAEADSPFF
 LCPAGGLCLDPTINDSATLDALFAALANG - - - - - SAPRALHCCGVYCIDLLLELADIDPFF
 LCPAGGLCLDPTINDSATLDALFAALANG - - - - - SAPRALHCCGVYCIDLLLELADIDPFF
 Ghazania_Receptor_RAT_AAD4165
 Ghazania_Receptor_Human_06039
 21659259_ECT3
 ELVYVGDGKYGALEHSHNTGLVODLLSHNNAVTSFSIHARSQVDFTSPPFSTSLGI
 ELVYVGDGKYGALEHSHNTGLVODLLSHNNAVTSFSIHARSQVDFTSPPFSTSLGI
 ELVYVGDGKYGALEHSHNTGLVODLLSHNNAVTSFSIHARSQVDFTSPPFSTSLGI

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 22

21699259_EXT3 MEFVRKALWLGIALALGPGSAGGHHPOP CGV LARLGGSVRLGALPRAP LARAKARAKALARA
 21699259_EXT2 MEFVRKALWLGIALALGPGSAGGHHPOP CGV LARLGGSVRLGALPRAP LARAKARAKALARA
 21699259_EXT3 MEFVRALWLGIALALGPGSAGGHHPOP CGV LARLGGSVRLGALPRAP LARAKARAKALARA
 21699259_EXT3 ALAPRLPHNLSTLELVVAAPPARDPASLTRGLCOALVPFGVALLAFPEARPELTQLHFLA
 21699259_EXT2 ALAPRLPHNLSTLELVVAAPPARDPASLTRGLCOALVPFGVALLAFPEARPELTQLHFLA
 21699259_EXT3 ALAPRLPHNLSTLELVVAAPPARDPASLTRGLCOALVPFGVALLAFPEARPELTQLHFLA
 21699259_EXT2 AATETPVLSLRRREARPLGAPNPEHLQLHWA SP LFTLLDVLVAVLQAHAWEDVGLACR
 21699259_EXT3 AATETPVLSLRRREARPLGAPNPEHLQLHWA SP LFTLLDVLVAVLQAHAWEDVGLACR
 21699259_EXT2 AATETPVLSLRRREARPLGAPNPEHLQLHWA SP LFTLLDVLVAVLQAHAWEDVGLACR
 21699259_EXT3 AATETPVLSLRRREARPLGAPNPEHLQLHWA SP LFTLLDVLVAVLQAHAWEDVGLACR
 21699259_EXT2 FQDPGGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRBDTGDAGLKARLAPMAAPVGGGEAPVPAAVLLGG
 21699259_EXT3 FQDPGGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRBDTGDAGLKARLAPMAAPVGGGEAPVPAAVLLGG
 21699259_EXT2 FQDPGGGLVALWTSRAGRPPQLVLDLSRBDTGDAGLKARLAPMAAPVGGGEAPVPAAVLLGG
 21699259_EXT3 D IARRRRVLEAVPPGPIHWLLGTP LPPKALPTAGLPPGLLAGEVARPPLBAIHDIVOLV
 21699259_EXT2 D IARRRRVLEAVPPGPIHWLLGTP LPPKALPTAGLPPGLLAGEVARPPLBAIHDIVOLV
 21699259_EXT3 D IARRRRVLEAVPPGPIHWLLGTP LPPKALPTAGLPPGLLAGEVARPPLBAIHDIVOLV
 21699259_EXT2 ARAALGSAAOVQPKRALLPAPVNGGDLQAPGPESPGREFLAREFLANTSFGGRTPVWVTGSS
 21699259_EXT3 ARAALGSAAOVQPKRALLPAPVNGGDLQAPGPESPGREFLAREFLANTSFGGRTPVWVTGSS
 21699259_EXT2 ARAALGSAAOVQPKRALLPAPVNGGDLQAPGPESPGREFLAREFLANTSFGGRTPVWVTGSS
 21699259_EXT3 QVHMSRHF KWSLRDRGAPAWATVGSWRDQLDLEPGGASAREPTPGGAOVWEKLRVY
 21699259_EXT2
 21699259_EXT3 T LLEHFFV FARD PDHGGGCGAGQICLDHGTND SATIDALFALANGSAPRAIRKCGYGYG
 21699259_EXT2 FDEDOQCBAQDLCIDBQIND SATIDALFALANGSAPRAIRKCGYGYG
 21699259_EXT3 FDEDOQCBAQDLCIDBQIND SATIDALFALANGSAPRAIRKCGYGYG
 21699259_EXT2 FDEDOQCBAQDLCIDBQIND SATIDALFALANGSAPRAIRKCGYGYG

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 22 Continued

21659259_EXT_3	RLLQARAAPAEAPPHSGRPGSQE
21659259_EXT_2	RLLQARAAPAEAPPHSGRPGSQE
21659259_EXT_1	RLLQARAAPAEAPPHSGRPGSQE

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 23

ACGCGTTACTCCTACCAGGTTGTAGCATGCATCTTTTGAGAGAGCAGCTGGGATCGAGTA
TACTCTTGACTTAAATATGTTTGTATATAAGACAAATGGAGAAATCAATTTTTCCCTGA
ATCTCTAGGAGCACCTTAGTGAATAAAGAACCTGACAGTATGCTGGCCACATGTTTAAGG
ACAAAGGTGCTGGGAAATAAGCAAGATCATAGAGGAGCTTCTTAATTGACCGAAGTCC
TGAGTACTCGAACCATTGAACTACTTGCCTCATGGACAGCTCATTGTAAATGATGGCA
TTAATTTATTGGGTGTGTTAGAAGAAGCAAGATTTTTGGTATTGACTCATTGATTGAACAC
CTAGAAGTGGCAATAAAGAATTCTCAACCACCGAGGATCATTCACCAATATCCCGAAAGG
AATTTGTCCGATTTTGTAGCAACTCCAACCAAGTCAGAACTGCGATGCCAGGGTTTGAA
CTTCAGTGGTGTGATCTTTCTCGTTTGGACCTTCGATACATTAACTTCAAAATGGCCAATT
TAAGCGCTGTAATCTTGACATGCAAACTTTGCTGTGCAAACTTTGAACGAGCTGATCTC
TCTGGATCAGTCTTGACTGTGCGAATCTCCAGGGAGTCAAGATGCTCTGTCTAATGCAG
AAGGAGCATCCCTGAACTGTGTAATTTGAGGATCCTCTGGTCTTAAAGCCAATTAGAG
AGGTGCTAATCTGAAAGGTGTGGATATGGAAGGAAGTCAGATGACAGGAATTAACCTGAG
AGTGGCTACCTTAAAAAATGCAAGTTGAAGAACTGTAACTCAGAGGAGCAACTCTGGC
AGGAACTGATTTAGAGAATTGTGATCTGTCTGGGTGTGATCTCAAGAAGCCAACCTGAGA
GGGTCCAACGTGAAGGGAGCTATATTGAAGAGATGCTGACCACTACACATGTACAAA
GTGTCAGATGAGAAATTTAGGGGCTGGAGGAAGATGTAAAGATGAAAATGTTTTCCTTAT
CACTTTCTTTCTCCACCACTCAGTTGCTAGAAAGAAATAACACTGTAAGGAAATTTAAAA
AAAAAAA

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 24

MLAHMFKDKGVWGNKQDHRGAFLIDRSPEYFEPILNYLRHGQLIVNDGINLLGVLEEARFFGID
SLIEHLEVAIKNSQPPEDHSPISRKEFVRFLATPTKSELRCQGLNFSGADLSRLDLRYINFKMAN
LSRCNLAHANLCCANLERADLSGSVLDGANLQGVKMLCSNAEGASLKLCNFEDPSGLKANLE
GANLKGVDMEGSQMTGINLRVATLKNALKNLCNLRGATLAGTDLENCDSLGCDDLQEANLRGS
NVKGAIFFEMLTPLHMSQSVR

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 25

Score = 1486 (523.1 bits), Expect = 1.4e-151, P = 1.4e-151
Identities = 286/286 (100%), Positives = 286/286 (100%), Frame
= +1

```
Query: 130 RSTLVNKEPDSMLAHMFKDKGVMGNKQDHRGAFLIDRSPEYFEPILNLYLRHQQLIVNDGI 309
      104 RSTLVNKEPDSMLAHMFKDKGVMGNKQDHRGAFLIDRSPEYFEPILNLYLRHQQLIVNDGI 163
Sbjct: 104 RSTLVNKEPDSMLAHMFKDKGVMGNKQDHRGAFLIDRSPEYFEPILNLYLRHQQLIVNDGI 163

Query: 310 NLLGVLEEARFFGIDSLIEHLEVAIKNSQPPEDHSPISRKEPVRFLLATPTKSELRCQGL 489
      164 NLLGVLEEARFFGIDSLIEHLEVAIKNSQPPEDHSPISRKEPVRFLLATPTKSELRCQGL 223
Sbjct: 164 NLLGVLEEARFFGIDSLIEHLEVAIKNSQPPEDHSPISRKEPVRFLLATPTKSELRCQGL 223

Query: 490 NFSGADLSRLDLRYINFYMANLSRCNLAAHANLCCANLERADLSGSVLDGANLQGVNMLCS 669
      224 NFSGADLSRLDLRYINFYMANLSRCNLAAHANLCCANLERADLSGSVLDGANLQGVNMLCS 283
Sbjct: 224 NFSGADLSRLDLRYINFYMANLSRCNLAAHANLCCANLERADLSGSVLDGANLQGVNMLCS 283

Query: 670 NAEASLKLGNFEDPSGLKANLEGANLKGVDMEGSQMTGINLRVATLQNAKLKNCNLGA 849
      284 NAEASLKLGNFEDPSGLKANLEGANLKGVDMEGSQMTGINLRVATLQNAKLKNCNLGA 343
Sbjct: 284 NAEASLKLGNFEDPSGLKANLEGANLKGVDMEGSQMTGINLRVATLQNAKLKNCNLGA 343

Query: 850 TLAGTDLENCDLSQCQLQANLGSNVKGATFEEMLTPLHMSQSVR 987
      344 TLAGTDLENCDLSQCQLQANLGSNVKGATFEEMLTPLHMSQSVR 389
Sbjct: 344 TLAGTDLENCDLSQCQLQANLGSNVKGATFEEMLTPLHMSQSVR 389
```

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 26

TTTCCAGGGTTCTAGCCTGTTTCATCTAGCCCCATGATGGCTGTGGACATCGAGTACAGATACAACTGCAT
GGCTCCTTCTTGGCCAGAGAGGTTTGCCTTTAAGATCTCACCAGCCAGCAACCAGTGAAGCCT
TGATTTAGCTGAGCAGCAAGAATGAAGCCAGTGAATGTTGGCCCGGCTGTCCAGGAGAGGAAGGTGA
AAAAGCGGGTGTCTTCGCAGACAACCAGGGCTGGCCCTGACAAATGGTCAAAGTGTCTCGGAATTCGA
TGACCCGCTAGATATGCCATTCAACATCACCGAGCTCCTAGACAACATTTGTAGCTTGACGACAGCAGAG
AGCGAGAGCTTTGTTCTGGATTTTCCAGCCCTCTGCAGATTACTTAGACTTTAGAAATCGACTTCAGG
CCGACCAGCTCTGCCTTGAGAACTGTGTCTCAAGSACAAGGCCATTGCAGGCACTGTGAAGTTTCAAA
CCTCGCAATTGAGAAGACCGTGAAAAAAGGATGACGTTTCGACACCTGGAAGAGCTACACAGACTTTTCT
TGTCAGTACGTGAAGGACACTTATGCCGGTTAGACAGGGACACGTTCTCCTTCGACATCAGCTTGCCCG
AGAAGATTACGTCTTATGAAAGAAATGGAGTTTGTGTGTACTACGAGTGCAATGGACAGAGTACTGGGA
CAGCAACAGAGGCAAGAACTATAGGATCATCCGGGCTGAGTTAAATCTACCCAGGGAATGACCAAGCCC
CACAGTGGACCGGATTGGGAATATCTTTGACAGTTTCGGAAGCCCTCGGTGTCTATGTTCTGTTTC
CAGAGTGGCCAAGTTACTTAGGATATGAAAAGCTAGGGCCCTACTACTAGTGAAGTGCAGGTGACAGGGCG
TGGCGGAGCTGCCACA

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 27

MMAVDIEYRYNCMAFSLRQERFAFKISPKPSKPLRPCIQLSSKNEASGMVAPAVQEKVKKRVSFADNQG
LALTMVKVFSEFDDPLDMPFNI TELLDNIIVSLTTAESEFVLDFSQPSADYLDFFRNRLQADHVCLENCVL
KDKAIAGTVKVQNLAFKTVKIRMTFDTWKSYTDFPCQYVKDTYAGSDRDTFSFDISLEFKIQSYERMEF
AVYYECNQTYWDSNRGKNYRIIRAELKSTQGMTKPHSGPDLGISPDQFGSPRCYGLFFEWFSYLGVEK
LGPYY

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 28

Score = 3195 (479.4 bits), Expect = 2.8e-138, P = 2.8e-138
 Identities = 763/903 (84%), Positives = 763/903 (84%), Strand = Plus / Plus

Query: 6 AGGGTTCTAGCCTCTTCACTAGCCCCCATGATGGCTGTGGACATCGAGTACAGATACAAC 65
 AG TTCTAGGCTG C TCTA C TGATGGC GTGGACAT GA TACAG TACA C
 Sbjct: 65 AGACTTCTAGCCTGCCCCCTCTAACG---TGATGGCGGTGGACATGAATACAGCTACAGC 121

Query: 66 TGCATGGCTCCTCTCTTGGGCCAAGAGAGGTTTGGCTTTAAGATCTCACCAGGCCGAGC 125
 G ATGGC CCTTC TGCGC AGAG G TT CCTT AAGATCTC CC AA C A C
 Sbjct: 122 AGTATGGCCCCCTCTCTGGCGCAGAGAGGCTTCACTTCAAGATCTCCCCCAAACGAAC 181

Query: 126 AAACCACTGAGGCTTTGATTTACGCTGAGCAGCAAGAAATGAAGCCAGTGAATGGTGGCC 185
 AA CCACTGAGGCTTTGATTTACGCTG CAGCAAG ATGAAGCC G GAATGGTGGCC
 Sbjct: 182 AAGCACTGAGGCTTTGATTTACGCTGGGCGAGCAAGGATGAAGCCGAGAAATGGTGGCC 241

Query: 186 CCGGCTGTCCAGGAGAAGAGTGAAGAGCGGGTGTCTTCCGACAGCAACTAGGGGCTG 245
 CC C GT CAGGAGAAGAGGTGA AAGCGGTGTCTTCCG GACAACTAGGGGCTG
 Sbjct: 242 CCCACAGTACAGGAGAAGAGTGAAGAGCGGGTGTCTTCCGACAGCAACTAGGGGCTG 301

Query: 246 GCGCTGACAAATGGTCAAAATGTTCTCGGAATTCGATGACCCCTAGATATGCCATTCAAC 305
 GCGCT ACAATGGT AAAGTGTCTCGGAATTCGATGACCC CTAGATAT CC TT AAC
 Sbjct: 302 GCGCTAACAATGGTGAAGTGTCTCGGAATTCGATGACCCCTAGATATTCGGTTTAAAC 361

Query: 306 ATCACGAGAGCTCTAGACAAACATTTGTGAGCTTGAAGACAGAGAGAGAGAGCTTTGTT 365
 ATCAC GAGCTCTAGACAAACAT GTGAG TGAAGACAGAGAGAG GAGAGCTTTGTT
 Sbjct: 362 ATCACTGAGCTCTAGACAAACATCTGAGTCTGAGACAGAGAGAGTGAAGCTTTGTT 421

Query: 366 CTGGATTTTTCGAGGCTCTGAGATTAATTAGACTTTAGAAATCGACTTCAGGCGGAC 425
 TGGATTTT C CAGCC TCTGAGATTAATTAGACTTTAGAAATCG CTTCAG CC AC
 Sbjct: 422 TTGATTTTTCGAGGCTCTCTGAGATTAATTAGACTTTAGAAATCGCTTCAGACCAAC 481

Query: 426 CACCTGTGCTTGAGAACTGTGTGCTCAAGGACAAGGCCATTCAGGCACTGTGAAGTT 485
 CA GTCTGCTT GA AAGTG GTGCT AAGGA AA GCGAT GC GGCAC GT AAGGT
 Sbjct: 482 CATGTCTGCTTGAGAACTGTGTGCTGAAGGAGAAGCCATTCGCGGACCTCAAGTTC 541

Query: 486 CAGAACTTCGCAATTGAGAGAGCGGTGAAGAAATGAAGATGACCTTCAGACCTGGAAGAGC 545
 CAGAACTT GCATP GAGAAG GTGAA AT AG ATGAC TTGGA ACCTGGAAG AGC
 Sbjct: 542 CAGAACTTCGCAATTGAGAGAGGTTGTGAAGATCAAGATGACATTCGATTAAGTGAAGG 601

Query: 546 TACACAGACTTTCCCTTGTCACTACGTGAAGGACACTTATGCGGTTTCAGACAGGGACAG 605
 T CACAGACTT CCTTTCAGTA GTGAGGACACTTA GC GGTTCAGACAGGGACAC
 Sbjct: 602 TTCACAGACTTTCCCTTGTCACTATGTGAAGGACACTTACGCTGTTTCAGACAGGGACACA 661

Query: 606 TTCTCCTTCGACATCAGCTTGCCTGAGAGATTCACTTTATGAAGAATGAGTTTCT 665
 TTCTCCTT GA ATCAGC T CC GAGAA AT CAGTCTTATGAAGAATGAGTTTCT
 Sbjct: 662 TTCTCCTTTGATATCAGCTTACCGGAGAAATCCAGTCTTATGAAGAATGAGTTTCT 721

Query: 666 GTGTACTAGAGTGCAATGGACAGAGCTACTGGGACAGCAAGAGGCAAGAACTATAGG 725
 GTGT CTACGAGT AA GG CAG CGTACTGGACAGCAACA AGGCAA AACTA AGG
 Sbjct: 722 GTGTGCTACGAGTGTAACGGCAGTCTACTGGGACAGCAAGAGGCAAGAACTACAGG 781

Query: 726 ATCATCCGGGCTGAGTTAAATCTACCCAGGGAATGACCAAGCCCCAGTGGACCGGAT 785
 ATCA C GGGC GA T A ATC ACCCAGGGAATGAC AGCC ACA TGG CCGGAT
 Sbjct: 782 ATCACCAGGGCGGAATCAGATCCACCCAGGGAATGACTGAGCCGTACAATGGGCGGAT 841

Query: 786 TTGGGAATATCTTTGACCAAGTTCCGAGAGCCCTCGGTGTCTTATGCTCTCTTTCCAGAG 845
 TT GGAAT TC TTTGACCAAGTTCCG AGCCCTCGGTGTCTT GTCTTTCCAGAG
 Sbjct: 842 TTTGGAATCTCTTTGACCAAGTTCCGAGAGCCCTCGGTGTCTTATGCTCTCTTTCCAGAG 901

Query: 846 TGGCCAAGTTACTTGGATATGAAGAGCTAGGGCCCTACTACTACTGCA-----CTGCAAG 900
 TGGCC AGTTA T GG TATGAAGAGCT GGGCCCTA TACTAGTGA CTGCAAG
 Sbjct: 902 TGGCCTAGTTATCTGGGATATGAAGAGCTAGGGCCCTATTACTAGTGAAGTGAAGTCAAGT 961

Query: 901 TGACAG 906
 TGACAG
 Sbjct: 962 TGACAG 967

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 29

Score = 1366 (480.9 bits), Expect = 1.3e-139, P = 1.3e-139
Identities = 255/284 (89%), Positives = 270/284 (95%)

Query: 2 MAVDIEYRYNCHAPSLRQERFAKISPKSPKPLRPCIQLSSKMEASGMVAPVQEKVKK 61
MAVDIEY Y+ MAPSLR+ERF FKISPK +KPLRPCIQL SK+EA MVAP VQEKVKK
Sbjct: 1 MAVDIEYSYSSMAPSLRRERFTFKISPKLNKPLRPCIQLGSKDEAGRMVAPTVOEKVKK 60

Query: 62 RVSFADNQGALATWVKVSEFDDPLDMFFNITELLNIVSLTTAESESFVLD FPSADY 121
RVSFADNQGALATWVKVSEFDDPLD+PPNITELLNIVSLTTAESESFVLD FPSADY
Sbjct: 61 RVSFADNQGALATWVKVSEFDDPLDIPFNITELLNIVSLTTAESESFVLD FPSADY 120

Query: 122 LDFRNRLQADHWCLNLCVLRKKAIACTVKVQNLAFETVKIRMTFDTWESYTD FPSQYVK 181
LDFRNRLQ +HWCLNLCVLR+KKAIACTVKVQNLAFET VKIRMTFDTWES+TDFPCQYVK
Sbjct: 121 LDFRNRLQTNHWCLNLCVLRKKAIACTVKVQNLAFETVKIRMTFDTWESYTD FPSQYVK 180

Query: 182 DTVAGSDRDTTFSFDSLPEKIQSYERMFAVYECNQTTWDSNRGKNYRIIRAEKSTQ 241
DTVAGSDRDTTFSFDSLPEKIQSYERMFAV YECNQ+YNDN+GKNYRI RAEK+STQ
Sbjct: 181 DTVAGSDRDTTFSFDSLPEKIQSYERMFAVYECNQSTWDSNRGKNYRIIRAEKSTQ 240

Query: 242 GMTKPHSGPDLGISFDQFGSPRCSYGLFPMPESYLGYEKLGPY 285
GMT+P++GPD GISFDQFGSPRCS+GLFPMPESYLGYEKLGPY
Sbjct: 241 GMTKPHSGPDLGISFDQFGSPRCSYGLFPMPESYLGYEKLGPY 284

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 30

Based on this alignment, black outlined amino acid residues indicate regions of conserved sequence (i.e., regions that may be required to preserve structural or functional properties); greyed amino acid residues can be mutated to a residue with comparable steric and/or chemical properties without altering protein structure or function (e.g. L to V, I, or M); non-highlighted amino acid residues can potentially be mutated to a much broader extent without altering structure or function.

```

Q63759_FPI_RAT      .....MAMDIEYSYSSMPSLR--RERITFEISPKLNKPLRPFCHOTG
AC016485_A          .....MAMDIEYRYNCMPSLR--QERIAFEISPKPSKPLRPFCHOLS
O08541_FPI_MOUSE    .....MAMRICLAHFFPLKSLGPTNGFCRNFVNNLKPLRPFCHSM-
AAD33215_FPIR5_HUMAN MIQVLDPRPLTSSVMPVDYMRICLAHFFPVKSLGPTNGFCRHHFVNNLKPLRSCENH-

Q63759_FPI_RAT      SKDEAGRMVAPTVEKKVSKKVSFADNQGLALTMKVFSFDDP--LEMPFNTHLGNL
AC016485_A          SKDEASGMVAPAVQEKKYKRVSEADNQGLALTMKVFSFDDP--LEMPFNTHLGNL
O08541_FPI_MOUSE    -KREAESQSEWRSPHNQAKRVVFADSKSLSLTAHHVFSGLPEPAWDLQFDHLNGLIS
AAD33215_FPIR5_HUMAN -NKKAESQNDWKCCHNQAKRVVFADSKSLSLTAHHVFSGLPEPAWDLQFDHLNGLIS

Q63759_FPI_RAT      VSLTTAESSESFVLDFFOPPSADYDFRNLNTHVCLNGLVLSAABAETVKVQNEAFERY
AC016485_A          VSLTTAESSESFVLDFFOPPSADYDFRNLNTHVCLNGLVLSAABAETVKVQNEAFERY
O08541_FPI_MOUSE    SSKLHEEKNLDFDFOPSTDYLSFRDHFQKMFVCLNGLSEETVTETVKVKNSEFERN
AAD33215_FPIR5_HUMAN SALKKHHEEKNLDFDFOPSTDYLSFRSHFQKMFVCLNGLSEETVTETVKVKNSEFERN

Q63759_FPI_RAT      VKIRMTFDTWKSYTFPPQVHEDTYAGSLRDTFSDDSLPEKIOSYSEMEFAMVEGNCCK
AC016485_A          VKIRMTFDTWKSYTFPPQVHEDTYAGSLRDTFSDDSLPEKIOSYSEMEFAMVEGNCCK
O08541_FPI_MOUSE    VQGRMTFDTWKSYTFDQVHEDTYAGSLRDTFSDDSLPEKIOSYSEMEFAMVEGNCCK
AAD33215_FPIR5_HUMAN VQIRMTFDTWKSYTFDQVHEDTYAGSLRDTFSDDSLPEKIOSYSEMEFAMVEGNCCK

Q63759_FPI_RAT      STWDSIRKGNRYIRAELE--STGMDPEYN-----GDFGISEDFGSPRCSYGLFPE
AC016485_A          STWDSIRKGNRYIRAELE--STGMDPEYS-----GDFGISEDFGSPRCSYGLFPE
O08541_FPI_MOUSE    TSWDNIKGNRYIRVHVQWPDGVGTQVAFKDCATGQGFKEEPTVFGSPRLASGLFPE
AAD33215_FPIR5_HUMAN VSWDNIKGNRYIRVHVQWPDGVGTQVAFKDCATGQGFKEEPTVFGSPRLASGLFPE

Q63759_FPI_RAT      WPSYLGVEKLGPMV
AC016485_A          WPSYLGVEKLGPMV
O08541_FPI_MOUSE    WQSGWRVENLTSRR
AAD33215_FPIR5_HUMAN WQSGWRMENLTSRR

```

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 31

CTGTCTCCTGCATTCTCCTGAAACCTTCATCCACACAATGCCTCCCAACCTCACTGGC
TACTACCGCTTTGTCTCGCAGAAGAACATGGAGGACTACCTGCAAGCCCTAAACATC
AGCTTGGCTGTGCGGAAGATCGCGCTGCTGCTGAAGCCGGACAAGGAGATCGAACA
CCAGGGCAACCACATGACGGTGAGGACGCTCAGCACCTTCCGAAACTACACTGTGC
AGTTTGATGTGGGAGTGGAGTTTGAGGAGGACCTCAGGAGCGTGGACGGACGAAAA
TGCCAGATCTCATTTCGTTCGGTTCGGATCCAAGCCAGTTCTGTGGTCAGCAAGGCTCC
CCTCTGGGCAGGCCCCCTGGTCAGAGGGAGTTTGTATCCTCAGGGAGGAGTTTGC
CTGACCTTCCGCACACAGCCTTCCTCGGAGAACAAAGACTGCCACCTCCACAAGGGC
TTCTGGCCCTTACCAAACCGTGGCCTTAAGTGGAAGCTTGAGTGACAGCTGAGGC
TGGGGACTCAGGGACACCTGGGCTGGATCCCAGCCCTGCC

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 32

MPPNLTGYRFFVSQKNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPDKEIEHQGNHMTVRTLSTFR
NYTVQFDVGVEFEEDLRSDGRKCCQISFVGSDPSQFCGQQGSPLGRPPGQREFVSSGRSL
RLTFRTPSSSENKTAHLHKGFLALYQTVALSGLSDS

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 33

Score = 355 (125.0 bits), Expect = 1.0e-31, P = 1.0e-31
Identities = 68/70 (97%), Positives = 70/70 (100%), Frame = +2

```
Query:   38 MPPNLTGYRFFVSQKNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKKEIEHQGNHMTVRTLSTFRN 217
          MPPNLTGYRFFVSQKNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKKEIEHQGNHMTVRTLSTFRN
Sbjct:    1 MPPNLTGYRFFVSQKNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKKEIEHQGNHMTVRTLSTFRN 60

Query:   218 YTVQFDVGVS 247
          YT+QFDVGVS+
Sbjct:    61 YTLQFDVGVSQ 70
```

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 34

CTGTCTCCTGCATTCTCCTGAAACCTTCATCCACACAATGCCTCCCAACCTCACTGGCTACTACCGCTTT
GTCTCGCAGAAGAACATGGAGGACTACCTGCAAGCCCTAAACATCAGCTTGGCTGTGCGGAAGATCGCGC
TGCTGCTGAAGCCGGACAAGGAGATCGAACACCAGGGCAACCACATGACGGTGAGGACGCTCAGCACCTT
CCGAAACTACACTGTGCAGTTTGATGTGGGAGTGGAGTTTGAGGAGGACCTCAGGAGCGTGACGGACGA
AAATGCCAGACCATAGTAACCTGGGAGGAGGACCTGGTGTGTGTGCAGAAAGGGGAGGTCCCCAACC
GGGGCTGGAGACACTGGCTGGAGGGAGAGTTGCTGTATCTGGAACTGACTGCAAGGGATGCAGTGTGCGA
GCAGGTCTTCAGGAAGGTGAGATAGCCGGAGAGGAGCCAAGATCCCTCCAGACAGCACCAGCTCACAGAC
GCTCTTGTGTGCCCCCTTCAAGCCGAGATTGTGCCAGATCTCATTCGTCGGTTCGGATCCAAGCCAGTT
CTGTGGTCAGCAAGGCTCCCCCTGSGCAGGCCCCCTGGTCAGAGGGAGTTGTATCCTCAGGGAGGAGT
TTGCGGCTGACCTTCGACACAGCCTTCCTCGGAGAACAGACTGCCACCTCCACAAGGCTTCCTGG
CCCTCTACCAACCCTGGGTGAGTGTCCCTCTGGGGGTGAGGGAGGAGCCTCTGTTCAGCCATGA
CCCTGSTATCTCAAGCCTTAAGTGAAGCTTGAGTGACAGCTGAGG

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 35

MPPNLTGYRFRVFSQKNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKKEIEHQGNHMTVRTLSFRNYTVQFDVGVE
FEEDLRSVDGRKCQTIVTWEEHLVCVQKGEVFNRGWRHWLEGELLYLELTARDAVCEQVFRKVR

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 36

Score = 712 (250.6 bits), Expect = 1.5e-69, P = 1.5e-69
Identities = 133/135 (98%), Positives = 135/135 (100%), Frame = +2

Query: 38 MPPNLTGYRFRVFSQNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKDEIEHQGRMTVRLSTFRN 217
MPPNLTGYRFRVFSQNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKDEIEHQGRMTVRLSTFRN
Sbjct: 1 MPPNLTGYRFRVFSQNMEDYLQALNISLAVRKIALLLKPKDEIEHQGRMTVRLSTFRN 60

Query: 218 YTVQFDVGVEFEEDLSVDGRKQTIIVTWEEHLVCVQKGEVPHRGWRHWLEGLLYLEL 397
YT+QFDVGVEFEEDLSVDGRKQTIIVTWEEHLVCVQKGEVPHRGWRHWLEGE+LYLEL
Sbjct: 61 YTLQFDVGVEFEEDLSVDGRKQTIIVTWEEHLVCVQKGEVPHRGWRHWLEGLLYLEL 120

Query: 398 TARDAVCEQVFRKVR 442
TARDAVCEQVFRKVR
Sbjct: 121 TARDAVCEQVFRKVR 135

WO 01/44473

PCT/US00/33909

FIG. 37

```
C018653_A MPFNLTYVRFVSQKNMEDYLOALNISLAVRKIALLLKPKDEIERQGNHMTVRTLSTFN
C018653_dal_ MPFNLTYVRFVSQKNMEDYLOALNISLAVRKIALLLKPKDEIERQGNHMTVRTLSTFN

C018653_A YTVQFDVGVEFEEDLRSVDGRKCCISFVGSIPSQFGGQSSPLGRFPQREIIVSSRSR
C018653_dal_ YTVQFDVGVEFEEDLRSVDGRKCCITVTWEEHLVVPKKIEVPNR--SWFPR--EPLLY

C018653_A LITFRTQPSSSENKTAHLHGGFLALYQTVALSGLSDS
C018653_dal_ LELTARDAVCEQVFRKVS-----
```

【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
21 June 2001 (21.06.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/044473 A3

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/705, 16/28, G01N 33/68, C12Q 1/68, A61K 38/17, 48/00, 39/395, 31/713
- (21) International Application Number: PCT/US00/33909
- (22) International Filing Date: 14 December 2000 (14.12.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- | | | |
|---------------|-------------------------------|----|
| 60/170,564 | 14 December 1999 (14.12.1999) | US |
| 60/173,165 | 27 December 1999 (27.12.1999) | US |
| 60/173,362 | 27 December 1999 (27.12.1999) | US |
| 60/173,544 | 29 December 1999 (29.12.1999) | US |
| Not furnished | 4 January 2000 (04.01.2000) | US |
| 60/223,929 | 9 August 2000 (09.08.2000) | US |
| Not furnished | 13 December 2000 (13.12.2000) | US |
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
- | | |
|----------|-------------------------------|
| US | 60/170,564 (CIP) |
| Filed on | 14 December 1999 (14.12.1999) |
| US | 60/173,165 (CIP) |
| Filed on | 27 December 1999 (27.12.1999) |
| US | 60/173,362 (CIP) |
| Filed on | 27 December 1999 (27.12.1999) |
| US | 60/173,544 (CIP) |
| Filed on | 29 December 1999 (29.12.1999) |
| US | 60/173,544 (CIP) |
| Filed on | 4 January 2000 (04.01.2000) |
| US | 60/223,929 (CIP) |
| Filed on | 9 August 2000 (09.08.2000) |
| US | 60/223,929 (CIP) |
| Filed on | 13 December 2000 (13.12.2000) |
- (71) Applicant (for all designated States except US): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 11th floor, 555 Long Wharf Drive, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): SPADERNA, Steven, K. [US/US]; 261 Deerfield Drive, Berlin, CN

[Continued on next page]

(54) Title: POLYPEPTIDES AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

MEMX polynucleotides and polypeptides encoded by the MEMX polynucleotides. Also provided are the antibodies that immunospecifically bind to a MEMX polypeptide or any derivative, variant, mutant or fragment of the MEMX polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the MEMX polypeptide, polynucleotide and antibody are utilized in the detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as to other uses.

MEMX polynucleotides and polypeptides encoded by the MEMX polynucleotides. Also provided are the antibodies that immunospecifically bind to a MEMX polypeptide or any derivative, variant, mutant or fragment of the MEMX polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the MEMX polypeptide, polynucleotide and antibody are utilized in the detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as to other uses.

WO 01/044473 A3

WO 01/044473 A3



06037 (US). **QUINN, Kerry, E.** [US/US]; 51 Greenfield Drive, Torrington, CT 06790 (US). **SHIMKETS, Richard, A.** [US/US]; 191 Leete Street, West Haven, CT 06516 (US). **PADIGARU, Muralidhara** [IN/US]; 98 Montoya Circle, Branford, CT 06405 (US). **SPYTEK, Kimberley, A.** [US/US]; 28 Court Street, #1, New Haven, CT 06511 (US).

(74) **Agent:** **ELRIFI, Ivor, R.**; Mintz, Levin, Cohan, 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, TR), 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:**
11 July 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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/US 00/33909
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/68 C12Q1/68 A61K38/17 A61K48/00 A61K39/395 A61K31/713		
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, SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Dat		
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: AL021392, 20 January 1998 (1998-01-20) WILLIAMS S: "Human DNA sequence from clone RP3-439F8 on chromosome 22q13.31-33 Contains part of the KIAA0767 gene and the first coding exon of a novel KIAA0279 LIKE cadherin domain protein (similar mouse Celsr1, rat MEGF2). Contains ESTs, an STS, GSSs and five putative CpG islands." XP002176243 --- -/--	1-17, 29-34
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 September 2001		Date of mailing of the international search report 21. 12. 01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Devijver, K

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC/US 00/33909

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: 095722, 1 May 1999 (1999-05-01) LLOYD D: "DJ1163J1.1 (ORTHOLOG OF MOUSE TRANSMEMBRANE RECEPTOR CELSR1 (KIAA0279 LIKE EGF-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN SIMILAR TO RAT MEGF2) (FRAGMENT)." XP002176244	1-17, 29-34
X	--- DATABASE EMBL [Online] accession: 09Y506, 1 November 1999 (1999-11-01) BARLOW K: "DJ996D20.1 (ORTHOLOG OF MOUSE TRANSMEMBRANE RECEPTOR CELSR1 (KIAA0279 LIKE EGF-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN SIMILAR TO RAT MEGF2) (FRAGMENT)." XP002176245	1-17, 29-34
X	--- DATABASE EMBL [Online] accession: AF031572; AF006014, 28 October 1998 (1998-10-28) HADJANTONAKIS A K ET AL: "Mus musculus seven-pass transmembrane receptor precursor (Celsr1) mRNA, complete cds." XP002176246	1-17, 29-34
X	--- WO 99 47669 A (SCHMITT ARMIN ;SPECHT THOMAS (DE); DAHL EDGAR (DE); HINZMANN BERND) 23 September 1999 (1999-09-23) SEQ ID NO 153; SEQ ID NO 174 claims 1-36	1-17,21, 29-36,42
P,X	--- DATABASE EMBL [Online] accession: AF231024, 5 April 2000 (2000-04-05) WU Q ET AL: "Homo sapiens protocadherin Flamingo 2 (FM12) mRNA, complete cds." XP002176247	1-17, 29-34
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 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 00/33909
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 23-28, 42, 43 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. ☒ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: in part: 22 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. ☐ 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.: Claims 1-43, partially, all as far as applicable. Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 00/33909

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: in part: 1-43 (all as far as applicable)

Polynucleotide and polypeptide relating to SEQ ID NOs 1 and 2, and variants and fragments thereof. Expression vector and host cell 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.

2. Claims: in part: 1-43 (all as far as applicable)

As invention 1, but limited to subject-matter relating to glutamate receptor splice variant polynucleotide SEQ ID NOs 3,5,7 and polypeptide SEQ ID NOs 4,6,8.

3. Claims: in part: 1-43 (all as far as applicable)

As invention 1, but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 9 and 10.

4. Claims: in part: 1-43 (all as far as applicable)

As invention 1, but limited to subject-matter relating to SEQ ID NOs 11 and 12.

5. Claims: in part: 1-43 (all as far as applicable)

As invention 1, but limited to subject-matter relating to retinol binding protein polynucleotide SEQ ID NOs 13,15 and polypeptide SEQ ID NOs 14,16.

International Application No. PCT/US 00/33909

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: in part: 22

Claim 22 refers to 'a method for modulating the activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising introducing 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				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 00/33909	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9947669	A	23-09-1999	DE 19813839 A1	23-09-1999	
			WO 9947669 A2	23-09-1999	
			EP 1064379 A2	03-01-2001	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	A 6 1 K 37/02	

- (31)優先権主張番号 60/173,544
 (32)優先日 平成11年12月29日(1999.12.29)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/223,929
 (32)優先日 平成12年8月9日(2000.8.9)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 09/735,981
 (32)優先日 平成12年12月13日(2000.12.13)
 (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,TR),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,S G,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 クイン, ケリー イー.
 アメリカ合衆国 コネチカット 06790, トリントン, グリーンフィールド ドライブ
 51

- (72)発明者 シムケッツ, リチャード エイ.
アメリカ合衆国 コネチカット 06516, ウェスト ハイブン, リート ストリート 1
91
- (72)発明者 マラリダラ, パディガル
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10561, ブロンクス, ラインランダー アベニュー 1
579, アパートメント 6イー
- (72)発明者 スパイテック, キンバリー エイ.
アメリカ合衆国 コネチカット 06511, ニュー ハイブン, ナンバー1, コート ス
トリート 28

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 CA04 DA02 DA05 DA11 HA08
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR14 QR20 QR32 QR36
QR42 QR55 QR72 QR74
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 MA01
NA14 ZA012 ZA162 ZA182 ZA332 ZA372 ZA542 ZA552 ZA812 ZA942
ZB072 ZB262 ZB332 ZC352
4C085 AA13 AA14 AA16 CC32 DD62 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA16
ZA18 ZA33 ZA37 ZA54 ZA55 ZA81 ZA94 ZB07 ZB26 ZB33
ZC35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 BA54 CA40 DA50 DA75 DA76
EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	多肽和编码它们的核酸		
公开(公告)号	JP2004509602A	公开(公告)日	2004-04-02
申请号	JP2001545550	申请日	2000-12-14
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	スパデルナスティーブンケイ クインケリーイー シムケッツリチャードエイ マラリダラパディガル スパイテックキンバリーエイ		
发明人	スパデルナ, スティーブン ケイ. クイン, ケリー イー. シムケッツ, リチャード エイ. マラリダラ, パディガル スパイテック, キンバリー エイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/566		
CPC分类号	A61K48/00 A61P3/10 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/HA08 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR72 4B063/QR74 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA332 4C084/ZA372 4C084/ZA542 4C084/ZA552 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZB072 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA33 4C086/ZA37 4C086/ZA54 4C086/ZA55 4C086/ZA81 4C086/ZA94 4C086/ZB07 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/170564 1999-12-14 US 60/173165 1999-12-27 US 60/173362 1999-12-27 US 60/173544 1999-12-29 US		

60/223929 2000-08-09 US
09/735981 2000-12-13 US

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本发明提供了新颖的分离的MEMX多核苷酸和由MEMX多核苷酸编码的多肽。还提供了与MEMX多肽或MEMX多肽，多核苷酸或抗体的任何衍生物，变体，突变体或片段免疫特异性结合的抗体。本发明还提供了将MEMX多肽，多核苷酸和抗体用于检测和治疗多种病理状态以及其他用途的方法。

1. **Introduction**
 2. **Background**
 3. **Methodology**
 4. **Results**
 5. **Discussion**
 6. **Conclusion**
 7. **References**
 8. **Appendix**
 9. **Figure 1**
 10. **Figure 2**
 11. **Figure 3**
 12. **Figure 4**
 13. **Figure 5**
 14. **Figure 6**
 15. **Figure 7**
 16. **Figure 8**
 17. **Figure 9**
 18. **Figure 10**
 19. **Figure 11**
 20. **Figure 12**
 21. **Figure 13**
 22. **Figure 14**
 23. **Figure 15**
 24. **Figure 16**
 25. **Figure 17**
 26. **Figure 18**
 27. **Figure 19**
 28. **Figure 20**
 29. **Figure 21**
 30. **Figure 22**
 31. **Figure 23**
 32. **Figure 24**
 33. **Figure 25**
 34. **Figure 26**
 35. **Figure 27**
 36. **Figure 28**
 37. **Figure 29**
 38. **Figure 30**
 39. **Figure 31**
 40. **Figure 32**
 41. **Figure 33**
 42. **Figure 34**
 43. **Figure 35**
 44. **Figure 36**
 45. **Figure 37**
 46. **Figure 38**
 47. **Figure 39**
 48. **Figure 40**
 49. **Figure 41**
 50. **Figure 42**
 51. **Figure 43**
 52. **Figure 44**
 53. **Figure 45**
 54. **Figure 46**
 55. **Figure 47**
 56. **Figure 48**
 57. **Figure 49**
 58. **Figure 50**
 59. **Figure 51**
 60. **Figure 52**
 61. **Figure 53**
 62. **Figure 54**
 63. **Figure 55**
 64. **Figure 56**
 65. **Figure 57**
 66. **Figure 58**
 67. **Figure 59**
 68. **Figure 60**
 69. **Figure 61**
 70. **Figure 62**
 71. **Figure 63**
 72. **Figure 64**
 73. **Figure 65**
 74. **Figure 66**
 75. **Figure 67**
 76. **Figure 68**
 77. **Figure 69**
 78. **Figure 70**
 79. **Figure 71**
 80. **Figure 72**
 81. **Figure 73**
 82. **Figure 74**
 83. **Figure 75**
 84. **Figure 76**
 85. **Figure 77**
 86. **Figure 78**
 87. **Figure 79**
 88. **Figure 80**
 89. **Figure 81**
 90. **Figure 82**
 91. **Figure 83**
 92. **Figure 84**
 93. **Figure 85**
 94. **Figure 86**
 95. **Figure 87**
 96. **Figure 88**
 97. **Figure 89**
 98. **Figure 90**
 99. **Figure 91**
 100. **Figure 92**
 101. **Figure 93**
 102. **Figure 94**
 103. **Figure 95**
 104. **Figure 96**
 105. **Figure 97**
 106. **Figure 98**
 107. **Figure 99**
 108. **Figure 100**
 109. **Figure 101**
 110. **Figure 102**
 111. **Figure 103**
 112. **Figure 104**
 113. **Figure 105**
 114. **Figure 106**
 115. **Figure 107**
 116. **Figure 108**
 117. **Figure 109**
 118. **Figure 110**
 119. **Figure 111**
 120. **Figure 112**
 121. **Figure 113**
 122. **Figure 114**
 123. **Figure 115**
 124. **Figure 116**
 125. **Figure 117**
 126. **Figure 118**
 127. **Figure 119**
 128. **Figure 120**
 129. **Figure 121**
 130. **Figure 122**
 131. **Figure 123**
 132. **Figure 124**
 133. **Figure 125**
 134. **Figure 126**
 135. **Figure 127**
 136. **Figure 128**
 137. **Figure 129**
 138. **Figure 130**
 139. **Figure 131**
 140. **Figure 132**
 141. **Figure 133**
 142. **Figure 134**
 143. **Figure 135**
 144. **Figure 136**
 145. **Figure 137**
 146. **Figure 138**
 147. **Figure 139**
 148. **Figure 140**
 149. **Figure 141**
 150. **Figure 142**
 151. **Figure 143**
 152. **Figure 144**
 153. **Figure 145**
 154. **Figure 146**
 155. **Figure 147**
 156. **Figure 148**
 157. **Figure 149**
 158. **Figure 150**
 159. **Figure 151**
 160. **Figure 152**
 161. **Figure 153**
 162. **Figure 154**
 163. **Figure 155**
 164. **Figure 156**
 165. **Figure 157**
 166. **Figure 158**
 167. **Figure 159**
 168. **Figure 160**
 169. **Figure 161**
 170. **Figure 162**
 171. **Figure 163**
 172. **Figure 164**
 173. **Figure 165**
 174. **Figure 166**
 175. **Figure 167**
 176. **Figure 168**
 177. **Figure 169**
 178. **Figure 170**
 179. **Figure 171**
 180. **Figure 172**
 181. **Figure 173**
 182. **Figure 174**
 183. **Figure 175**
 184. **Figure 176**
 185. **Figure 177**
 186. **Figure 178**
 187. **Figure 179**
 188. **Figure 180**
 189. **Figure 181**
 190. **Figure 182**
 191. **Figure 183**
 192. **Figure 184**
 193. **Figure 185**
 194. **Figure 186**
 195. **Figure 187**
 196. **Figure 188**
 197. **Figure 189**
 198. **Figure 190**
 199. **Figure 191**
 200. **Figure 192**
 201. **Figure 193**
 202. **Figure 194**
 203. **Figure 195**
 204. **Figure 196**
 205. **Figure 197**
 206. **Figure 198**
 207. **Figure 199**
 208. **Figure 200**
 209. **Figure 201**
 210. **Figure 202**
 211. **Figure 203**
 212. **Figure 204**
 213. **Figure 205**
 214. **Figure 206**
 215. **Figure 207**
 216. **Figure 208**
 217. **Figure 209**

[illegible]

METEORITIC AND ASTEROIDAL IMPACTS HAVE BEEN PROPOSED AS A CAUSE OF THE
 MASS EXTINCTION OF THE DINOSAURS AND OTHER MAMMALS AT THE CRETACEOUS-PALEOGENE
 BOUNDARY. THE EVIDENCE FOR THIS THEORY INCLUDES THE DISCOVERY OF IRIDIUM
 ANOMALIES IN THE LAYERS OF THE BOUNDARY, THE PRESENCE OF SHOCKED MINERALS
 AND GLAUCOPHANE IN THE LAYERS OF THE BOUNDARY, AND THE DISCOVERY OF A
 LARGE IMPACT CRATER IN THE YUCATAN PENINSULA, MEXICO. THE CRATER IS
 KNOWN AS CHICXULUB AND IS BELIEVED TO HAVE BEEN FORMED BY THE IMPACT
 OF A LARGE ASTEROID OR COMET. THE CRATER IS APPROXIMATELY 180 KILOMETERS
 IN DIAMETER AND IS BELIEVED TO HAVE BEEN FORMED ABOUT 65 MILLION YEARS
 AGO. THE CRATER IS NOW BURIED UNDER A THICK LAYER OF SEDIMENT, BUT
 THE EVIDENCE FOR ITS EXISTENCE IS STRONG. THE CRATER IS BELIEVED TO
 HAVE BEEN THE CAUSE OF THE MASS EXTINCTION OF THE DINOSAURS AND OTHER
 MAMMALS AT THE CRETACEOUS-PALEOGENE BOUNDARY. THE CRATER IS NOW
 BEING STUDIED BY A TEAM OF SCIENTISTS FROM THE UNITED STATES AND
 MEXICO. THE TEAM IS CURRENTLY CONDUCTING RESEARCH ON THE CRATER AND
 ITS IMPACT ON THE ENVIRONMENT. THE RESEARCH IS BEING CONDUCTED IN
 ORDER TO BETTER UNDERSTAND THE CAUSE OF THE MASS EXTINCTION AND
 TO DEVELOP STRATEGIES FOR PREVENTING SUCH EXTINCTIONS IN THE FUTURE.