

(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2004-515216

(P2004-515216A)

(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(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	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	Z 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 49/00	Z 4 B O 6 4
A 6 1 K 49/00	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 224 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-502128 (P2002-502128)	(71) 出願人	301005050 インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) (22) 出願日	平成13年6月6日 (2001.6.6)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月5日 (2002.12.5)	(72) 発明者	ラル、ブリーティ アメリカ合衆国カリフォルニア州95056・サンタクララ・ビーオーボックス 5142
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/018476		
(87) 国際公開番号	W02001/094587		
(87) 国際公開日	平成13年12月13日 (2001.12.13)		
(31) 優先権主張番号	60/210, 233		
(32) 優先日	平成12年6月6日 (2000.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/213, 465		
(32) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/249, 019		
(32) 優先日	平成12年11月14日 (2000.11.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞外メッセンジャー

(57) 【要約】

本発明は細胞外メッセンジャー (X M E S) および X M E S を同定し、コードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、X M E S の異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (d) を有する群から選択した実質上単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるようなアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片 10

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択した請求項 1 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択した請求項 4 に記載の単離されたポリヌクレオチド。 20

【請求項 6】

請求項 3 に記載のポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、 30

(a) 前記ポリペプチドの発現に好適な条件下で、請求項 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合されたプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチドで形質転換された細胞を培養するステップと、

(b) このように発現したポリペプチドを回収するステップとを含む。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項 11】

以下の (a) 乃至 (d) を有する群から選択した単離されたポリヌクレオチド。

(a) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド 40

(b) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のポリヌクレオチド

(c) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(d) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (a) ~ (d) の RNA 等価物

【請求項 12】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドの少なくとも 60 の連続したヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 11 に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中 50

から検出する方法であって、

(a) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする方法。

【請求項14】

前記プローブが少なくとも60の連続したヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】

請求項11に記載のポリヌクレオチドの配列を有する標的ポリヌクレオチドをサンプル中から検出する方法であって、

(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項16】

請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを有することを特徴とする成分。

【請求項17】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16に記載の成分。

【請求項18】

機能的なXME Sの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項16の組成物を投与することを特徴とする治療方法。

【請求項19】

請求項1に記載のポリペプチドのアゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項20】

請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項21】

機能性XME Sの発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項20に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項22】

請求項1に記載のポリペプチドのアンタゴニストとして有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出するステップとを含むことを特徴とするスクリーニング方法。

【請求項23】

請求項22に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容でき

10

20

30

40

50

る賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

【請求項 24】

機能性 X M E S の過剰発現に関連する疾患又は病状の治療方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して請求項 23 に記載の成分を投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 1 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 適切な条件下で請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、

10

(b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項 1 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、

20

(b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、

(c) 試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項 27】

請求項 5 の配列を含む標的ポリヌクレオチドの発現を変化させるのに効果的な化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露するステップと、

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、

30

(c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 28】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

(a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、

(b) 処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項 11 のポリヌクレオチドの少なくとも 20 の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 11 のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、

40

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

(d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項 29】

生物学的サンプル中の X M E S の発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、

(a) 前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体が形成されるのに適した条件下で、前記生物学的サンプルを請求項 10 に記載の抗体と結合する過程

50

と、

(b) 前記複合体を検出する過程とを含み、前記複合体の存在が、前記生物学的サンプル中の前記ポリペプチドの存在と相関することを特徴とする方法。

【請求項30】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) Fab断片

(d) F(ab')₂断片

(e) ヒト化抗体のいずれかであることを特徴とする請求項10に記載の抗体。

10

【請求項31】

請求項10に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む化合物。

【請求項32】

被検者のXME Sの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項31に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項33】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項31に記載の化合物。

【請求項34】

被検者のXME Sの発現に関連する病状又は疾患の診断方法であって、請求項33に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項35】

請求項10に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項36】

請求項35に記載の方法で産出した抗体。

30

【請求項37】

請求項36に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項38】

請求項10に記載の抗体の特異性を有する抗体を用いてモノクローナル抗体を製造する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 不死化の細胞を用いて前記抗体産出細胞を融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクローナル抗体から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項39】

請求項38に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項40】

請求項39に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

50

【請求項 4 1】

F a b 発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 4 2】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 4 3】

S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項 1 0 に記載の抗体をインキュベートする過程と、 10

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項 4 4】

S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

(a) 前記抗体と前記ポリペプチドの特異結合を許容する条件下で、サンプルを用いて請求項 1 0 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法 20

【請求項 4 5】

S E Q I D N O : 1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 6】

S E Q I D N O : 2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 7】

S E Q I D N O : 3 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 8】

S E Q I D N O : 4 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 4 9】

S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 0】

S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 1】

S E Q I D N O : 7 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 2】

S E Q I D N O : 8 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 3】

S E Q I D N O : 9 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。 40

【請求項 5 4】

S E Q I D N O : 1 0 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 5】

S E Q I D N O : 1 1 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 6】

S E Q I D N O : 1 2 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO : 13 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 58】

SEQ ID NO : 14 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 59】

SEQ ID NO : 15 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 60】

SEQ ID NO : 16 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。 10

【請求項 61】

SEQ ID NO : 17 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 62】

SEQ ID NO : 18 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、細胞外メッセンジャーの核酸配列及びアミノ酸配列に関する。本発明はまた、これらの配列を利用した神経の疾患、自己免疫または炎症性疾患、発生または発達障害、内分泌障害および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、細胞外メッセンジャーの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価に関する。 20

【0002】

(発明の背景)

細胞間伝達は多細胞生物の成長と生存に必須である。特に内分泌系、神経系、免疫系の機能に必須である。更に細胞間伝達は組織作製と器官形成などの発生プロセスにとって極めて大切である。その場合細胞増殖、細胞分化および形態形成が空間的また時間的に正確な協働作用で調整されなければならない。細胞は、ホルモン、成長因子、神経ペプチド、サイトカインなどのシグナル分子の多様なタイプの分泌と取り込みによって互いに伝達しあう。 30

【0003】

ホルモン

ホルモンはシグナル伝達分子であり、胚形成から成人まで基本的な生理的プロセスを協働して調整する。これらのプロセスには代謝、呼吸、生殖、排出、胎児組織分化、器官形成、成長、発達、恒常性およびストレス反応が含まれる。ホルモン分泌と神経系は密接に組み込まれており、互いに依存している。ホルモンは主に視床下部と脳下垂体、甲状腺と副甲状腺、膵臓、副腎、卵巣、精巣の内分泌腺で分泌される。 40

【0004】

循環へのホルモンの分泌は厳密に制御されている。ホルモンはしばしば日周期性パターン、拍動周期パターン、及び周期性パターンで分泌される。ホルモン分泌は、血液生化学の変動、他の上流で作用するホルモン、神経インパルス、負のフィードバックループにより調整される。血中ホルモン濃度は常に監視され、最適の安定したレベルを維持するように調整される。いったん分泌されると、ホルモンは特異的受容体を発現する標的細胞だけに作用する。

【0005】

多くの内分泌系の疾患は、ホルモンの分泌不全あるいは分泌過多により引き起こされる。分泌不全は、源泉であるホルモンの腺が損傷したりあるいは正常に機能しない場合にしば 50

しば発生する。分泌過多は、ホルモン分泌細胞に由来する腫瘍の増殖に多くの場合起因する。不適切なホルモンレベルは、調節フィードバックループあるいはホルモン前駆体のプロセッシングにおける障害により引き起こされる場合がある。内分泌系機能障害は、標的細胞がホルモンに反応しない場合に発生する場合もある。

【0006】

ホルモンは生化学的に、ポリペプチド、ステロイド、エイコサノイドまたアミンとして分類される。インスリンや成長ホルモンなど多様なホルモンを含むポリペプチドホルモンは、大きさや機能が様々である。多くの場合不活性の前駆体として合成され、細胞内で成熟した活性化状態へ処理される。アミンホルモンにはエピネフリン、ドーパミンがあり、神経内分泌シグナリングで機能するアミノ酸誘導体である。ステロイドホルモンにはコレステロールに由来するホルモンエストロゲン、テストステロンがあり、性的成長と生殖において機能する。エイコサノイドホルモンにはプロスタグランジン、プロスタシクリンがあり、多様なプロセスで機能する脂肪酸誘導体である。多くのポリペプチドホルモンとある種のアミンホルモンは、循環血液中で可溶性であり、分泌後数秒以内にタンパク質分解を受けやすい。ステロイドホルモンとエイコサノイドホルモンは不溶性であり、循環血液中では担体タンパク質によって輸送される必要がある。今からの記述では、主にポリペプチドホルモンに焦点を合わせる。

10

【0007】

視床下部と脳下垂体によって分泌されたホルモンは、神経信号に反応して他の内分泌腺から協調的にホルモン分泌を調節することにより内分泌機能において重大な役割を演じる。視床下部ホルモンには、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン、成長ホルモン放出因子、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、サブスタンスP、ドーパミン、プロラクチン放出ホルモンがある。これらのホルモンは、脳下垂体の前葉からホルモンの分泌を直接調節する。下垂体の前葉ホルモンによって分泌されたホルモンには、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、メラニン細胞刺激ホルモン、成長ホルモンおよびプロラクチンなどのソマトトロピンホルモン、甲状腺刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモン(LH)また卵胞刺激ホルモン(FSH)などの糖蛋白質ホルモン、-リポトロピン、-エンドルフィンがある。これらのホルモンは、甲状腺、膵臓、副腎からホルモン分泌を調節する。また生殖器官に直接作用して、排卵と精子形成を刺激する。下垂体後葉は、抗利尿ホルモン(ADH、バソプレシン)とオキシトシンを合成、分泌する。

20

30

【0008】

視床下部と下垂体の疾患は多くの場合、原発性脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる。このような疾患は他の内分泌腺の機能に重大な影響を及ぼす。下垂体低下に関連した疾患には、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、カルマン症候群、ハンドシュラークリスチャン病、レトラシヴェ病、サルコイドーシス、トルコ鞍空虚症(empty sella)、小人症が含まれる。下垂体機能亢進症に関連した疾患には、良性線種によって発生しやすい抗利尿ホルモン(ADH)不适当分泌症候群(SIADH)及び先端巨大症、巨人症が含まれる。

40

【0009】

甲状腺、副甲状腺によって分泌されるホルモンは、それぞれ主に代謝速度と血清カルシウムレベルの調製を制御する。甲状腺ホルモンには、カルシトニン、ソマトスタチン、甲状腺ホルモンが含まれる。副甲状腺は、副甲状腺ホルモンを分泌する。甲状腺機能低下症に関連した疾患には、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)、クレチン病を含む。甲状腺機能亢進症に関連した疾患には、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレース病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む。副甲状腺機能亢進症に関連する疾患には、骨再吸収と副甲状腺肥大を招くConn病(chronic hypercalcemia)がある。

50

【0010】

膵臓によって分泌されるホルモンは、糖質、脂肪、タンパク質代謝の割合を調節して血糖値を調節する。膵臓ホルモンには、インシュリン、グルカゴン、アミリン、 α -アミノ酪酸、ガストリン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチドがある。膵臓の機能障害に関連する主な疾患には、不十分なインシュリン活性により引き起こされる糖尿病がある。糖尿病は、通常タイプI（インシュリン依存性糖尿病、若年性糖尿病）あるいはタイプII（インシュリン非依存性糖尿病、成人型糖尿病）のどちらかに分類される。インシュリン補充療法による両者の治療は公知である。糖尿病は通常、低血糖症（インシュリン・ショック）、昏睡、糖尿病性ケトアシドーシス、乳酸アシドーシスなどの急性合併症を引き起こす。また目、腎臓、皮膚、骨、関節、循環系、神経系の疾患や感染への抵抗低下を招く慢性合併症も引き起こす。

10

【0011】

ホルモン機能に関連する解剖、生理機能、病気については、次に参照されている。McCance, K. L. 及び Huether, S. E. (1994) Pathophysiology: The Biological Basis for Disease in Adults and Children, Mosby - Year Book, Inc., St. Louis, MO; Greenspan, F. S. 及び Baxter, J. D. (1994) Basic and Clinical Endocrinology, Appleton and Lange, East Norwalk, CT. Growth Factors

20

成長因子は、細胞間伝達を仲介する分泌性蛋白質である。循環系を通過して長距離を移動するホルモンとは異なり、ほとんどの成長因子は主に局所的なメディエータであり、隣接する細胞に作用する。ほとんどの成長因子は、成長因子を分泌経路に導く疎水性N末端シグナルペプチド配列を含む。またほとんどの成長因子は分泌経路内で翻訳後修飾される。このような修飾には、蛋白質分解、グリコシル化、リン酸化、分子内ジスルフィド結合形成が含まれることもある。一旦分泌されると、成長因子は隣接する標的細胞の表面上で特異的受容体に結合する。そして結合した受容体は細胞内シグナル伝達経路を誘発する。これらのシグナル伝達経路は、標的細胞で特異的な細胞応答を引き起こす。これらの応答には遺伝子発現の調節と細胞分裂、細胞分化、細胞運動の刺激または阻害が含まれることもある。

30

【0012】

成長因子は、少なくとも2つのクラスに大きく分類され、これらのクラスには重複も見られる。一番大きなクラスには、効果が広範囲にわたる、大きなポリペプチド成長因子が含まれる。これらの因子には、上皮成長因子（EGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、トランスフォーミング成長因子 β （TGF β ）、インシュリン様成長因子（IGF）、神経成長因子（NGF）、及び血小板由来の成長因子（PDGF）が含まれる。それぞれは多数の関連する因子のファミリーを定義する。NGF（神経成長因子）を除いて大きなポリペプチド成長因子は、多様な細胞型において創傷治癒、骨合成、再形成、細胞外マトリックス合成、そして上皮、表皮、結合組織の増殖を刺激する分裂促進因子として作用する。TGF β 、EGF、FGFファミリーのメンバーは、胚芽腫の分化において誘導信号としても作用する。NGFは神経栄養因子として特異的に機能し、ニューロンの成長と分化を促進する。

40

【0013】

別の成長因子のクラスには造血性成長因子が含まれており、標的特異性において狭い。造血性成長因子は、Bリンパ球、Tリンパ球、赤血球、血小板、好酸球、好塩基球、好中球、マクロファージ、及びそれらの幹細胞前駆体のような血液細胞の増殖及び分化を刺激する。造血性成長因子にはコロニー形成活性化因子（G-CSF、M-CSF、GM-CSF、CSF1-3）、赤血球生成促進因子、サイトカインが含まれる。サイトカインは免疫システムの細胞によって分泌される特殊な造血性因子であり、以下に詳述する。

【0014】

50

成長因子は、in vitroでの細胞の腫瘍性転化、及びin vivoでの腫瘍進行において重大な役割を果たす。大きなポリペプチド成長因子の過剰な発現は、培地において細胞の増殖と形質転換を促進する。in vivoの腫瘍細胞による成長因子の不適的な発現は、腫瘍の血管新生及び転移に貢献しうる。造血性成長因子の不適切な活性によって、貧血、白血病、及びリンパ腫が結果として起こり得る。更に成長因子は、腫瘍性タンパク質に構造的、機能的両方に関連する。腫瘍性タンパク質は、プロトオンコジーンの生成物で潜在的な発癌性がある。特定のFGFとPDGFファミリーメンバ-自体が腫瘍性タンパク質に相同であるが、EGF、NGF及びFGFファミリーの特定のメンバ-ではそれらの受容体がプロトオンコジーンによってコードされる。成長因子もプロトオンコジーン及び腫瘍抑制因子遺伝子の双方の転写調節に影響を与える(Pimentel, E. (1994) Handbook of Growth Factors, CRC Press, Ann Arbor, MI; McKay, I.及びLeigh, I., 編集(1993) Growth Factors: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, NY; Habenicht, A., 編集(1990) Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines, Springer-Verlag, New York, NY.)。

10

【0015】

更に、一部の大きなポリペプチド成長因子は、発達中の胚の始原胚葉の誘導において重要な役割を果たす。この誘導により究極的には胚の中胚葉、外胚葉、内胚葉の形成がなされる。そして完全な成体の体制のためのフレームワークを提供する。この誘導プロセスの崩壊は、胚発育にとって破滅的となるであろう。

20

【0016】

小さなペプチド因子 - 神経ペプチド及び血管介在物質

神経ペプチド及び血管介在物質(NP/VM)は、通常20以下のアミノ酸である小さなペプチド因子のファミリーを構成する。これらの因子は通常はニューロンの興奮と血管収縮/血管拡張、筋肉収縮、脳や他の内分泌組織からのホルモン分泌の阻害において機能する。このファミリーに含まれるのは、神経ペプチド及び神経ペプチドホルモンとして、ボンベシン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、ニューロメディンN、メラノコルチン、オピオイド、ガラニン、ソマトスタチン、タキキニン、ウロテンシンII及び平滑筋刺激に關与する関連のペプチド、バソプレッシンペプチド、血管作用性小腸ペプチド、また循環系で運ばれるシグナル伝達分子として、アンジオテンシン、補体、カルシトニン、エンドセリン、ホルミルメチオニルペプチド、グルカゴン、コレシストキニン、ガストリン及び上記で取り上げた多くのペプチドホルモンである。NP/VMは、直接信号を伝達し、別の神経伝達物質及びホルモンの活性若しくは遊離を調節し、またシグナル伝達カスケードにおいて触媒酵素として働き得る。NP/VMの時間効果は、極端に短い時間から長時間の持続性までの広い範囲にわたる(Martin, C. R.ら(1985) Endocrine Physiology. Oxford University Press, New York, NY, 57-62ページ参照)。

30

【0017】

サイトカイン

サイトカインは、免疫システム及び炎症反応を調節するシグナル分子のファミリーを構成する。サイトカインは、損傷あるいは感染に反応して通常白血球あるいは白血球細胞によって分泌される。サイトカインは、Bリンパ球、Tリンパ球、単球、マクロファージ、顆粒球などの免疫システムの細胞に主に作用する成長及び分化因子として機能する。他のシグナル伝達分子のようにサイトカインは特異的原形質膜受容体に結合する。そして遺伝子発現パターンを変える細胞内シグナル伝達経路を誘発する。炎症と免疫システムの疾患の治療におけるサイトカインの使用に関しては、非常に大きな可能性がある。

40

【0018】

サイトカイン構造と機能は、in vitro. で非常に良く特徴付けられてきた。多く

50

のサイトカインは30Kダルトン以下の小さなポリペプチドである。50を越えるサイトカインがヒト及びげっし類から同定されてきた。サイトカインサブファミリーの例には、インターフェロン(IFN- α 、 β 及び γ)、インターロイキン(IL1-IL13)、腫瘍壊死因子(TNF- α 及び β)とケモカインがある。多くのサイトカインは組換えDNA技術を利用して生成されてきた。また個々のサイトカインの活性は*in vitro*で決定されてきた。これらの活性は、白血球増殖、分化、運動の調節を含む。

【0019】

*in vitro*の個々のサイトカインの活性は、*in vivo*でのサイトカインの活性の完全な範囲を反映していないかもしれない。サイトカインは*in vivo*では個々に発現されず、その生物体が刺激で攻撃された時に、種々の他のサイトカインと共に発現する。ともにこれらのサイトカインは、その特異な刺激に適切な方法で集団的に免疫応答を調節する。よってサイトカインの生理学的活性は、刺激自体と同時に発現されるサイトカイン中での複雑に相互作用するネットワークによっても決定される。これらの同時に発現されるサイトカインは相乗的な関係、および相反する関係の両方を示すことがある。

10

【0020】

ケモカインは、30を越えるメンバーでサイトカインサブファミリーを構成する(Wellis, T. N. C. 及び Peitsch, M. C. (1997) J. Leukoc. Biol. 61:545-550を参照)。当初、ケモカインは、炎症の部位に単球とマクロファージを動員する走化性タンパク質として同定された。最近の証拠によると、造血及びHIV-1感染においても、ケモカインは重要な役割を演じる。ケモカインは、分子量約6-15Kダルトンの範囲の小さなタンパク質である。更にケモカインは、重要なシステイン残基の数と位置に基づいてC、CC、CXC、あるいはCX₃Cに分類される。例えばCCケモカインは、2つの連続したシステインから成る保存されたモチーフを含み、それに続いてそれぞれ24残基間隔及び16残基間隔で離れた2つの付加的なシステインを含む。(EXPASY PROSITE database, documents PS00472 及び PD0C00434)。これら4つのシステイン残基の存在と間隔は高度に保存される。しかし介在している残基は著しく異なる。しかしシステインダブレットのおよそ15残基下流に位置するチロシンは保存されており、走化活性にとって重要であるように思われる。CCケモカインをコード化する多くのヒト遺伝子は、染色体17上に集まっている。しかし他の所にマッピングされるCCケモカイン遺伝子の例が、少数ある。ケモカインには、他にもリンフォタクチン(lymphotactin)(Cケモカイン)、マクロファージ走化性及び活性因子(MCAF/MCP-1、CCケモカイン)、血小板因子4及びIL-8(CXCケモカイン)そしてフラクタルカイン(fractalkine)またneurotractin(CX₃Cケモカイン)がある(Luster, A. D. (1998) N. Engl. J. Med. 338:436-445を参照)。

20

30

【0021】

新規の細胞外メッセンジャー、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、神経系疾患、自己免疫/炎症の疾患、発生または発達障害、内分泌障害および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・予防において有用であり、また、細胞外メッセンジャーの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価にも有用である。

40

【0022】

(発明の概要)

本発明は、集合的には「XMES」、個別には「XMES-1」、「XMES-2」、「XMES-3」、「XMES-4」、「XMES-5」、「XMES-6」、「XMES-7」、「XMES-8」及び「XMES-9」と呼ばれるような、実質上精製されたポリペプチドである細胞外メッセンジャーに特徴がある。或る実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペ

50

チド、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片を含む群から選択した実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、SEQ ID NO: 1-9のアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供する。

【0023】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドをコードするような実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 10-18を有する群から選択される。

【0024】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列からなる天然のポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと機能的に結合したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

【0025】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む実質上単離されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a)組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b)そのように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【0026】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような実質上単離された抗体を提供する。

【0027】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと、(b) SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一であるポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列を有する天然のポリヌクレオチドと、(c)(a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドと、(d)(b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドと、(e)(a)~(d)のRNA等価物とで構成される群から選択した実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドは少なくとも60の連続したヌクレオチドを有する。

【0028】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで、標的ポリヌクレオチドは(a)SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b)SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド配列、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e)(a)~(d)のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a)サンプル中の標的ポリヌクレオチドに相補的な配列からなる少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて該サンプルをハイブリダイズする過程と、(b)ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程からなり、プローブと標的ポリヌクレオチドの間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、プローブは標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。一実施態様では、プローブは少なくとも60の連続したヌクレオチドを含む。

10

【0029】

本発明は更に、サンプル中の標的ポリヌクレオチドを検出する方法を提供する。ここで標的ポリヌクレオチドは、(a)SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドと、(b)SEQ ID NO: 10-18を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%が同一であるポリヌクレオチド配列を有する天然のポリヌクレオチドと、(c)(a)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドと、(d)(b)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドと、または(e)(a)~(d)のRNA等価物とを含む群から選択したポリヌクレオチド配列を有する。検出方法は、(a)ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b)標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

20

30

【0030】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供し、有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列、(b)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む。一実施例では、SEQ ID NO: 1-9からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的XME Sの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

40

【0031】

本発明はまた、(a)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド、(b)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有するアミノ酸配列を含む天然のポリペプチド、(c)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの生物学的活性断片、または(d)SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの免疫抗原性断片を含む群から選択されたアゴニストとしてのポリペプチドの有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a)ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b)サン

50

ブル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。一実施態様では、本発明は機能性 X M E S の発現低下に関連する疾患又は病状を治療する方法であって、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を含む方法を提供する。

【0032】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的 X M E S の過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

10

【0033】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも1つの試験化合物に結合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

20

【0034】

更に本発明は、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 からなる一群から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドと、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 からなる一群から選択されたアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる天然のポリペプチドと、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 からなる一群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片と、(d) SEQ ID NO: 1 - 9 からなる一群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片とで構成される群から選択されたポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

30

【0035】

その方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも1つの試験化合物と混合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、(c) 試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

40

【0036】

本発明は更に、標的ポリヌクレオチドの変異発現の有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。標的ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a) 標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b) 標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

【0037】

本発明は更に、(a) 核酸を含む生物学的サンプルを試験化合物で処理する過程と、(b) (i) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を

50

含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含む天然のポリヌクレオチド、(iii)(i)に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物を含む群から選択したポリヌクレオチドの少なくとも20の連続したヌクレオチドから構成されるプローブを用いて、処理した生物学的サンプルの核酸をハイブリダイズする過程とを含む試験化合物の毒性の算定方法を提供する。ハイブリダイゼーションは、上記プローブと生物学的サンプル中の標的ポリヌクレオチドの間に特定のハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で発生し、上記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(ii) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有するポリヌクレオチド配列を含む天然のポリヌクレオチド、(iii)(i)のポリヌクレオチドに相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv)(ii)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v)(i)~(iv)のRNA等価物を含む群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i)~(v)を含む群から選択したポリヌクレオチド配列の断片と、(c)ハイブリダイゼーション複合体の量を定量する過程と、(d)処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量を、非処理の生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量と比較する過程を含み、処理した生物学的サンプルのハイブリダイゼーション複合体の量の差は、試験化合物の毒性を示す。

10

20

【0038】

(発明を実施するための形態)

本発明のタンパク質、ヌクレオチド配列及び方法について説明するが、その前に、説明した特定の装置、材料及び方法に本発明が限定されるものではなく、改変し得ることを理解されたい。また、ここで使用する専門用語は特定の実施例を説明する目的で用いたものに過ぎず、特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図したものではないことも併せて理解されたい。

【0039】

請求の範囲及び明細書中で用いている単数形の「或る」及び「その(この)」の表記は、文脈から明らかにそうでないとされる場合を除いて複数ものを指す場合もあることに注意しなければならない。従って、例えば「或る宿主細胞」と記されている場合にはそのような宿主細胞が複数あることもあり、「或る抗体」と記されている場合には単数または複数の抗体、及び、当業者に公知の抗体の等価物等についても言及しているのである。

30

【0040】

本明細書中で用いる全ての専門用語及び科学用語は、特に定義されている場合を除き、当業者に一般に理解されている意味と同じ意味を有する。本明細書で説明するものと類似あるいは同等の任意の装置、材料及び方法を用いて本発明の実施または試験を行うことができるが、ここでは好適な装置、材料、方法について説明する。本発明で言及する全ての刊行物は、刊行物中で報告されていて且つ本発明に関係があるであろう細胞株、プロトコル、試薬及びベクターについて説明及び開示する目的で引用しているものである。本明細書のいかなる開示内容も、本発明が先行技術の効力によってこのような開示に対して先行する権利を与えられていないことを認めるものではない。

40

【0041】

(定義)

用語「X M E S」は、天然、合成、半合成或いは組換え体など全ての種(特にウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及びヒトを含む哺乳動物)から得られる実質的に精製されたX M E Sのアミノ酸配列を指す。

【0042】

用語「アゴニスト」は、X M E Sの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。アゴニストの例として、タンパク質、核酸、糖質、小分子その他の任意の化合物や成分を挙げ

50

ることができるが、これらはX M E S と直接相互作用することによって、或いはX M E S が関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、X M E S の活性を調節する。

【0043】

用語「対立遺伝子変異配列」は、X M E S をコードする遺伝子の別の形を指す。対立遺伝子変異体は、核酸配列における少なくとも1の突然変異から作製し得る。また、変異mRNAまたはポリペプチドからも作製し得る。ポリペプチドの構造または機能は、変異することもしないこともある。遺伝子は、天然の対立遺伝子変異体を全く有しないか、1つ若しくは数個の天然の対立遺伝子変異体を有し得る。一般に対立遺伝子変異体を生じさせる通常の突然変異性変化は、ヌクレオチドの自然欠失、付加または置換に帰するものである。これら各変化は、単独或いは他の変化と共に、所定の配列内で1回若しくは数回生じ得る。

10

【0044】

X M E S をコードする「変異」核酸配列は、様々なヌクレオチドの欠失、挿入、或いは置換が起こっても、X M E S と同じポリペプチド或いはX M E S の機能特性の少なくとも1つを備えるポリペプチドを指す。この定義には、X M E S をコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適當或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにX M E S をコードするポリヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチドプローブを用いて容易に検出可能な或いは検出困難な多形性を含む。コードされたタンパク質も変異され得り、サイレント変化を生じX M E S と機能的に等価となるアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。計画的アミノ酸置換は、X M E S の生物学的または免疫学的活性が保持される限りにおいて、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性特性の類似性に基づき行い得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

20

【0045】

「アミノ酸」または「アミノ酸配列」の語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド若しくはタンパク質の配列またはその断片を指し、天然または合成分子を指す。ここで、「アミノ酸配列」は天然のタンパク質分子のアミノ酸配列を指すものであり、「アミノ酸配列」及び類似の語は、アミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に会合する完全な本来のアミノ酸配列に限定しようとするものではない。

30

【0046】

「増幅」は、核酸配列の追加複製に関連する。増幅は通常、当業者によく知られたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて行う。

【0047】

用語「アンタゴニスト」は、X M E S の生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストとしては、抗体などのタンパク質、核酸、糖質、小分子またはその他の任意の化合物や成分を挙げることができるが、これらはX M E S と直接相互作用することによって、或いはX M E S が関与する生物学的経路の構成エレメントに作用することによって、X M E S の活性を調節する。

40

【0048】

「抗体」の語は、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばF a、F (a b ')₂ 及びF v断片を指すが、これらはエピトープの決定基と結合することができる。X M E S ポリペプチドと結合する抗体は、抗体を免疫する小ペプチドを含む無傷の分子またはその断片を用いて作製可能である。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、翻訳または化学合成されたRNAに由来し得るもので、好みに応じて担体タンパク質に接合することも可能である。通常用いられる担体

50

であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0049】

「抗原決定基」の語は、特定の抗体と接触している分子の領域（即ちエピトープ）を指す。タンパク質またはタンパク質断片を用いて宿主動物を免疫化する場合、タンパク質の多数の領域が、抗原決定基（タンパク質の特定の領域または3次元構造）に特異結合する抗体の産生を誘導し得る。抗原決定基は、抗体に結合するための無損傷抗原（即ち免疫応答を誘導するために用いられる免疫原）と競合し得る。

【0050】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」（コード）鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸（PNA）や、ホスホリチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドがある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」若しくは「マイナス（-）」の語が対応するDNA分子のアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス（+）」が対応するDNA分子のセンス鎖を指すことがある。

10

20

【0051】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のX M E S、合成のX M E Sまたはそれらの任意のオリゴペプチドが、適当な動物或いは細胞の特定の免疫応答を誘発して特定の抗体と結合する能力を指す。

【0052】

「相補（的）」または「相補性」の語は、塩基対形成によりアニーリングする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、配列「5'-A G T-3'」は、相補配列「3'-T C A-5'」に結合する。

30

【0053】

「所定のポリヌクレオチド配列からなる成分」及び「所定のアミノ酸配列からなる成分」は、概して所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列からなる任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。X M E S 若しくはX M E S の断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。このプローブは、凍結乾燥状態で保存可能であり、糖質などの安定化剤と結合させることが可能である。ハイブリダイゼーションにおいては、塩（例えばNaCl）、界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム；SDS）及びその他の構成エレメント（例えばデンハート液、脱脂粉乳、サケの精子のDNA等）を含む水溶液中にプローブを分散させることができる。

40

【0054】

「コンセンサス配列」は、不要な塩基を分離するためにDNA配列の解析を繰り返し行い、XL-PCRキット（Applied Biosystems, Foster City CA）を用いて5'及び/または3'の方向に伸長され、再度シーケンシングされた核酸配列、またはG E L V I E W 断片構築システム（G C G, Madison, WI）またはP h r a p （University of Washington, Seattle WA）等の断片構築用のコンピュータプログラムを用いて1つ或いはそれ以上の重複するcDNAやEST、またはゲノムDNA断片から構築された核酸配列を指す。伸長及びアセンブルの両方を行ってコンセンサス配列を決定する配列もある。

50

【0055】

「保存的なアミノ酸置換」は、置換がなされた時に元のタンパク質の特性を殆ど損なわないような置換、即ちタンパク質の構造と特に機能が保存され、そのような置換による大きな変化がない置換を指す。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

【0056】

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	10
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	
Gln	Asn, Glu, His	
Glu	Asp, Gln, His	
Gly	Ala	
His	Asn, Arg, Gln, Glu	
Ile	Leu, Val	
Leu	Ile, Val	
Lys	Arg, Gln, Glu	
Met	Leu, Ile	20
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	
Tyr	His, Phe, Trp	
Val	Ile, Leu, Thr	

【0057】

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや ヘリックス構造、(b)置換部位における分子の電荷または疎水性、及び/または(c)側鎖の大部分を保持する。

【0058】

「欠失」は、結果的に1個若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0059】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシル基またはアミノ基による水素の置換は、ポリヌクレオチド配列の化学修飾に含まれ得る。ポリヌクレオチド誘導体は、天然分子の生物学的または免疫学的機能を少なくとも1つは保持しているポリペプチドをコードする。ポリペプチド誘導体は、グリコシル化、ポリエチレングリコール化(pegylation)、或いは任意の同様なプロセスであって誘導起源のポリペプチドから少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持しているプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0060】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を生成することができ、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドに共有結合または非共有結合するようなレポーター分子または酵素を指す。

【0061】

「示差発現」は少なくとも2つの異なったサンプルを比較することによって決められる、増加、または非調節、あるいは減少、下方調節、または欠損遺伝子またはタンパク発現を指す。このような比較は例えば、治療後サンプルと未治療のサンプルまたは病態のサンプルと正常サンプルの間で行われ得る。

【0062】

用語「断片」は、X M E S または X M E S をコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列 (p a r e n t s e q u e n c e) と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。断片は、画定された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5 ~ 1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から優先的に選択し得る。例えば、ポリペプチド断片は、所定の配列に示すような最初の250または500アミノ酸またはポリペプチドの(最初の25%または50%)から選択された或る長さの連続したアミノ酸を有し得る。これらの長さは明らかに例として挙げているものであり、本発明の実施例では、配列表、表及び図面を含む明細書に裏付けされた任意の長さであってよい。

10

【0063】

S E Q I D N O : 10 - 18 の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、S E Q I D N O : 10 - 18 を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。S E Q I D N O : 10 - 18 の断片は、例えば、ハイブリダイゼーション及び増幅技術において、或いは関連するポリヌクレオチド配列からS E Q I D N O : 10 - 18 を区別する類似の方法において有用である。S E Q I D N O : 10 - 18 の断片の正確な長さ及び断片に対応するS E Q I D N O : 10 - 18 の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

20

【0064】

S E Q I D N O : 1 - 9 の断片は、S E Q I D N O : 10 - 18 の断片によってコードされる。S E Q I D N O : 1 - 9 の断片には、S E Q I D N O : 1 - 9 を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、S E Q I D N O : 1 - 9 の断片は、S E Q I D N O : 1 - 9 を特異認識する抗体を産出するための免疫抗原性ペプチドとして有用である。S E Q I D N O : 1 - 9 の断片及び断片に対応するS E Q I D N O : 1 - 9 の領域の正確な長さは、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

30

【0065】

「完全長」ポリヌクレオチド配列とは、少なくとも1つの翻訳開始コドン(例えばメチオニン)、オープンリーディングフレーム及び翻訳終止コドンを有する配列である。「完全長」ポリヌクレオチド配列は、「完全長」ポリペプチド配列をコードする。

【0066】

「相同性」の語は、配列類似性即ち2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の配列間で互換可能な配列同一性である。

【0067】

ポリヌクレオチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴリズムを用いてアラインメントされた少なくとも2つ以上のポリヌクレオチド配列間で一致する残基の割合を意味する。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

40

【0068】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、M E G A L I G N v e r s i o n 3 . 1 2 e 配列アラインメントプログラムに組込まれているようなC L U S T A L V アルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、L A S E R G E N E ソフトウェアパッケージ(一組の分子生物学的分析プログラム)(D N A S T A R , M a d i s o n W I)の一部である。このC L U S T A L V は、H i g g i n s , D . G . 及び P . M . S h a r p (1 9 8 9) C A B I O S 5 : 1 5 1 - 1 5 3、H i g

50

gins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8:189-191に記載されている。ポリヌクレオチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonals saved」=4と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

【0069】

或いは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)が一般的に用いられ、且つ、無料で入手可能な配列比較アルゴリズム一式を提供している(Altschul, S.F.ら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)。このアルゴリズムは、幾つかの情報源から入手可能であり、メリーランド州ベセスダにあるNCBI及びインターネット(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)からも入手可能である。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastnとblastp(後述)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる。例えば、2つのヌクレオチド配列を比較するために、デフォルトパラメータとして設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12(2000年4月21日)を用いてblastnを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

【0070】

Matrix: BLOSUM62
 Reward for match: 1
 Penalty for mismatch: -2
 Open Gap 5 及び Extension Gap: 2 penalties
 Gap x drop-off: 50
 Expect: 10
 Word Size: 11
 Filter: on

【0071】

一致率は、完全に画定された(例えば特定の配列番号で画定された)配列長さと比較して測定し得る。或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定された配列から得られた断片(例えば少なくとも20、30、40、50、70、100または200の連続したヌクレオチドの断片)の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

【0072】

高度の相同性を示さない核酸配列が、それにもかかわらず遺伝子コードの縮重が原因で類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。この縮重を利用して核酸配列内で変化を生じさせて、全ての核酸配列が実質上同一のタンパク質をコードするような多数の核酸配列を生成し得ることを理解されたい。

【0073】

ポリペプチド配列に適用される「一致率」または「一致%」の語は、標準化されたアルゴ

10

20

30

40

50

リズムを用いてアラインメントされた少なくとも2以上のポリペプチド配列間で一致する残基の割合を意味する。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を（従って機能も）保存する。

【0074】

ポリペプチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e 配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる（既に説明したのでそれを参照されたい）。CLUSTAL Vを用いて、ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple = 1、gap penalty = 3、window = 5、「diagonals saved」= 5と設定する。デフォルトの残基重み付け表としてPAM250マトリクスを選択する。ポリヌクレオチドアラインメントと同様に、CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリペプチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。

10

【0075】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.12（2000年4月21日）でblastpを使用するであろう。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

20

【0076】

Matrix: BLOSUM62
 Open Gap 11 及び Extension Gap: 1 penalties
 Gap x drop-off: 50
 Expect: 10
 Word Size: 3
 Filter: on

【0077】

一致率は、完全に画定された（例えば特定の配列番号で画定された）ポリペプチド配列の長さと比較して測定し得る。一致率は、配列或いは、より短い長さ、例えばより大きな画定されたポリペプチド配列から得られた断片（例えば少なくとも15、20、30、40、50、70または150の連続した残基の断片）の長さと比較して一致率を測定してもよい。ここに挙げた長さは単なる例示的なものに過ぎず、表、図及び配列リストを含めた本明細書に記載された配列に裏付けられた任意の配列長さの断片を用いて、或る長さであってその長さに対して一致率を測定し得る長さを説明し得ることを理解されたい。

30

【0078】

「ヒト人工染色体（HAC）」は、約6 kb（キロベース）～10 MbのサイズのDNA配列を含み得る、安定した染色体複製の分離及び維持に必要な全てのエレメントを含む直鎖状の小染色体である。

40

【0079】

「ヒト化抗体」の語は、非抗体結合領域におけるアミノ酸配列はヒト抗体により近づくように変異させた抗体分子であって、本来の結合能力はそのまま保持しているような抗体分子を指す。

【0080】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイ

50

ブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニールングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニールングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1%（w/v）のSDS、並びに約100μg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

【0081】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点（ T_m ）より約5～20℃低くなるように選択する。この T_m は、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。 T_m を計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NYに記載されており、特に2巻の9章を参照されたい。

【0082】

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約0.1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、42℃の温度で行う。SSC濃度は、約0.1%のSDS存在下で、約0.1～2×SSCの範囲で変化し得る。通常は、ブロッキング剤を用いて非特異ハイブリダイゼーションを阻止する。このような遮断試薬には、例えば、約100～200μg/mlのせん断され変性したサケ精子DNAが含まれる。特定条件下で、例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約35～50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【0083】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る（ $C_0.t$ または $R_0.t$ 解析等）。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体（例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラスライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質）に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0084】

「挿入」及び「付加」の語は、1個若しくは数個のアミノ酸残基またはヌクレオチド配列を各々付加するようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。

【0085】

「免疫応答」は、炎症、外傷、免疫異常症、伝染性疾患または遺伝性疾患に関連する症状を指し得る。これらの症状は、細胞及び全身の防御系に作用し得る種々の因子、例えばサイトカイン、ケモカイン、その他のシグナル伝達分子の発現によって特徴づけることができる。

【0086】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなXME5のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。「免疫抗原性断片」の語には、本明細書中で開示したような或いは当分野で既知であるような任意の抗体産出方法

において有用な X M E S の任意のポリペプチドまたはオリゴペプチド断片も含まれる。

【0087】

「マイクロアレイ」の語は、基質上の複数のポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物の構成を指す。

【0088】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイにおいて、特異的な所定の位置を有するポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0089】

「調節(する)」の語は、X M E S の活性の変化を指す。調節することによって例えば、X M E S のタンパク質活性、結合特性その他の生物学的、機能的または免疫学的特性が増大または低下し得る。

10

【0090】

「核酸」及び「核酸配列」の語は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたはこれらの断片を指す。「核酸」及び「核酸配列」の語は、ゲノム起源または合成起源の D N A または R N A であって一本鎖または二本鎖であるか或いはセンス鎖またはアンチセンス鎖を表し得るような D N A または R N A や、ペプチド核酸(P N A)や、任意の D N A 様または R N A 様物質を指すこともある。

【0091】

「機能的に結合した」は、第1核酸配列が第2核酸配列と機能的な関係があるように配置された状態を指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合には、そのプロモーターはそのコード配列に機能的に結合している。同一のリーディングフレーム内で2つのタンパク質コード領域を結合する必要がある場合、一般に、機能的に結合した D N A 配列は非常に近接するか、或いは連続し得る。

20

【0092】

「ペプチド核酸」(P N A)は、アンチセンス分子または抗遺伝子物質であって、リジンを末端とするアミノ酸残基のペプチドバックボーンに結合した、少なくとも約5ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドからなるものを指す。末端のリジンは、成分に溶解性を与える。P N A は、相補的一本鎖 D N A または R N A に優先的に結合して転写の拡張を停止するものであり、ポリエチレングリコール化して細胞における P N A の寿命を延長し得る。

30

【0093】

X M E S の「翻訳後修飾」には、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、蛋白分解性切断及びその他の当分野で既知の修飾を含まれ得る。これらのプロセスは、合成或いは生化学的に生じ得る。生化学的修飾は、X M E S の酵素環境に依存し、細胞タイプによって変化し得る。

【0094】

「プローブ」とは、同一配列或いは対立遺伝子核酸配列、関連する核酸配列の検出に用いる、X M E S やそれらの相補配列、またはそれらの断片をコードする核酸配列のことである。プローブは、単離されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであって、検出可能な標識またはレポーター分子に結合したものである。典型的な標識には、放射性アイソトープ、リガンド、化学発光試薬及び酵素がある。「プライマー」は、短い核酸、通常は D N A オリゴヌクレオチドであり、相補的塩基対を形成することで標的ポリヌクレオチドにアニーリングされ得る。プライマーは次に、D N A ポリメラーゼ酵素によって標的 D N A 鎖に延在し得る。プライマー対は、例えばポリメラーゼ連鎖反応(P C R)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

40

【0095】

本発明に用いるようなプローブ及びプライマーは通常、既知の配列の少なくとも15の連続したヌクレオチドを含んでいる。特異性を高めるために長めのプローブ及びプライマー、例えば開示した核酸配列の少なくとも20、25、30、40、50、60、70、80、90、100または150の連続したヌクレオチドからなるようなプローブ及びプラ

50

イマーを用いてもよい。これよりもかなり長いプローブ及びプライマーもある。表、図面及び配列リストを含む本明細書に裏付けされた任意の長さのヌクレオチドを用いることができるものと理解されたい。

【0096】

プローブ及びプライマーの調製及び使用方法については、Sambrook, J. ら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. ら, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis ら (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, San Diego CA等を参照されたい。PCRプライマー対は、その目的のためのコンピュータプログラム、例えばPrimer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA)を用いるなどして既知の配列から得ることができる。

10

【0097】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute/MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能)ではユーザーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。Primer3は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である。(後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい。)PrimerGenプログラム(英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト・リソースセンターから一般向けに入手可能)は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

20

30

40

【0098】

「組換え核酸」は天然配列ではない配列であるか或いは人為的に組み合わせなければ離隔しているような配列の2以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献(前出)に記載されているような遺伝子工学的的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロ

50

モーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠なエレメントであって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【0099】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの不可欠なエレメントであって例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。ワクシニアウイルスは組換え核酸が発現する哺乳動物のワクチン接種に用いるもので、哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【0100】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の未翻訳領域に由来する核酸配列であり、エンハンサー、プロモーター、イントロン及び5'及び3'の未翻訳領域(UTR)を含む。調節エレメントは、転写、翻訳またはRNA安定性を調節する宿主またはウイルスタンパク質と相互作用する。

10

【0101】

「レポーター分子」とは、核酸、アミノ酸または抗体を標識するのに用いられる化学的または生化学的成分である。レポーター分子には、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤、基質、補助因子、阻害因子、磁気粒子及びその他の当分野で既知の成分がある。

【0102】

DNA配列に関する「RNA等価物」は、発生した窒素塩基チミンが全てウラシルに置換されていることと、糖のバックボーンがデオキシリボースではなくリボースから構成されていることを除いて、参照DNA配列と同一のヌクレオチド線形配列から構成されている。

20

【0103】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。XMES、XMESをコードする核酸、またはその断片を含むと推定されるサンプルは、体液と、細胞からの抽出物や細胞から単離された染色体や細胞内小器官、膜と、細胞と、溶液中に存在するまたは基板に固定されたゲノムDNA、RNA、cDNAと、組織と、組織プリント等を含み得る。

【0104】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造(例えば抗原決定基即ちエピトープ)であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された遊離したA及びその抗体を含む反応において、エピトープA(つまり遊離し、標識されていないA)を含むポリヌクレオチドの存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

30

【0105】

「実質上精製された」の語は、自然環境から取り除かれ、或いは単離または分離された核酸またはアミノ酸配列であって、自然に会合するその他の構成エレメントの少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、最も好ましいのは少なくとも約90%が遊離しているものを指す。

40

【0106】

「置換」は、1個若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドを各々別のアミノ酸またはヌクレオチドに置換することを意味する。

【0107】

「基質」は、任意の好適な固体または半固体の支持体を指すものであって、膜、フィルタ、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁性非磁性ビーズ、ゲル、管、プレート、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、壁、溝、ピン、チャンネル、孔等、様々な表面形態を有することができ、基質表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0108】

「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発

50

現の集合的パターンを指す。

【0109】

「形質転換」は、外来性のDNAが宿主細胞に入り込み、宿主細胞を変化させるプロセスを表す。形質転換は、本技術分野で知られている種々の方法に従って自然条件または人工条件下で生じ得るものであり、外来性の核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一時的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

10

【0110】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の有機体であり、限定するものではないが動植物を含み、有機体の1個若しくは数個の細胞が、ヒトの関与によって、例えば本技術分野でよく知られている形質転換技術によって導入された異種核酸を有する。核酸の細胞への導入は、直接または間接的に、細胞の前駆物質に導入することによって、計画的な遺伝子操作によって、例えば微量注射法によって或いは組換えウイルスの導入によって行う。遺伝子操作の語は、古典的な交雑育種或いは*in vitro*受精を指すものではなく、組換えDNA分子の導入を指すものである。本発明に基づいて予期される遺伝形質転換体には、バクテリア、シアノバクテリア、真菌及び動植物がある。本発明の単離されたDNAは、本技術分野で知られている方法、例えば感染、形質移入、形質転換またはトランス接合によって宿主に導入することができる。本発明のDNAをこのような有機体に移入する技術はよく知られており、前出のSambrookら（1989）等の参考文献に記載されている。

20

【0111】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列1本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも40%の相同性を有する核酸配列であると定義する。その際、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequences」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体（前述）、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの交互スプライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」（SNP）を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

30

40

【0112】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の1本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも40%の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。ここで、デフォルトパラメータに設定した「BLAST 2 Sequence」ツールVersion 2.0.9（1999年5月7日）を用いてblastpを実行する。このようなポリペプチド対は、ポリペプチドの1つの所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、9

50

4 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【0113】

(発明)

本発明は、新規のヒト細胞外メッセンジャー(XMES)及びXMESをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した神経の疾患、自己免疫/炎症疾患、発生または発達障害、内分泌障害および癌を含む細胞増殖異常の診断、治療、及び予防に関する。

【0114】

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名の概略である。各ポリヌクレオチド及びその対応するポリペプチドは、1つのIncyteプロジェクト識別番号(IncyteプロジェクトID)と相関する。各ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO)とIncyteポリペプチド配列番号(IncyteポリペプチドID)によって表示した。各ポリヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド配列識別番号(ポリヌクレオチドSEQ ID NO)とIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)によって表示した。

10

【0115】

表2は、GenBankタンパク質(genpept)データベースに対するBLAST分析によって同定されたような、本発明のポリペプチドとの相同性を有する配列を示している。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(Polypeptide SEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号(Incyte Polypeptide ID)を示す。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号(Genbank ID NO:)を示す。列4は、各ポリペプチドとそのGenBank相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、GwnBank相同体のアノテーションを示し、更に該当箇所には適当な引用文も示す。これらを引用することを以って本明細書の一部とする。

20

【0116】

表3は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドに対するポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteポリペプチド配列番号(Incyte Polypeptide ID)を示す。列3は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列4および列5はそれぞれ、GCG配列分析ソフトウェアパッケージのMOTIFSプログラム(Genetics Computer Group, Madison WI)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ(signature)配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。

30

【0117】

表2及び3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドが細胞外メッセンジャーであることを確立している。例えば、SEQ ID NO: 2は1210アミノ酸で、ラットニューレキシンIII-(GenBank ID g394600)と96%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された。(表2参照)BLASTの確率スコアは0.0であり、探しているポリペプチド配列アラインメントが偶然の一致により得られる確率を示す。この分析に基づき、SEQ ID NO: 2はヒトニューレキシンである。別の例において、SEQ ID NO: 1はBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって同定されるmac25(g3721617)(インシュリン様成長因子として知ら

40

50

れるタンパク質のクラスを結合するタンパク質)に240アミノ酸で39%の同一性を有する。その確立スコアは 3.3×10^{-42} である(表2)。更なる代わりの例として、SEQ ID NO: 3はヒト線維芽成長因子19 (GenBank ID g4514718)と39%の同一性を有することがBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって示された。(表2参照)BLAST確率スコアは 1.5×10^{-22} であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO: 3はまた、線維芽成長因子ドメインを有し、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。

(表3参照)BLIMPS及びPROFILESCAN解析よりのデータは、SEQ ID NO: 3が線維芽成長因子である、さらに実証的な証拠を提供する。別の例において、SEQ ID NO: 6はBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)によって同定されたウシ軟骨由来の形態形成タンパク質 (GenBank ID g632490)に81%同一である。(表2参照)BLAST確率スコアは 7.5×10^{-185} であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。SEQ ID NO: 6はまた、TGF- β プロペプチドドメインとTGF- β 様ドメインを有し、これは、隠れマルコフモデル(HMM)を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのPFAMデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。(表3参照)BLIMPS解析から得られたデータによって、さらにSEQ ID NO: 6がTGF- β ファミリータンパク質であることが裏付けられた。SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9については、同様の方法で分析し、注釈を付けた。SEQ ID NO: 1-9の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7で記述されている。

【0118】

表4に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、cDNA配列またはゲノムDNA由来のコード(エキソン)配列を用いて、或いはこれら2種類の配列を任意に組み合わせ構築した。列1および列2はそれぞれ、本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリペプチド配列識別番号(Polynucleotide SEQ ID NO:)およびそれに対応するIncyteポリヌクレオチドコンセンサス配列番号(Incyte Polynucleotide ID)を示す。列3は、塩基対における各ポリヌクレオチド配列の長さを示す。列4は、例えば、SEQ ID NO: 10-18を同定するため、或いはSEQ ID NO: 10-18と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列5はcDNA配列、ゲノムDNAから予想されたコード配列(エキソン)及び/またはcDNA及びゲノムDNAを共に有する配列集合に対応する識別番号を示している。これらの配列は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列をアセンブルするのに用いた。表4の列6および列7はそれぞれ完全長配列に対して、列5の配列に対応するcDNA配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

【0119】

表4の列5の識別番号は、特に例えばIncyte cDNAとそれに対応するcDNAライブラリに照会し得る。cDNAライブラリが示されていないIncyte cDNAは、プールされているcDNAライブラリ(例えば、70656442V1)に由来する。または、列5の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いたGenBankのcDNAすなわちEST(例えば、g3153915)の識別番号の場合もある。或いは列5の識別番号は、ゲノムDNAのGenscan分析により予想されるコード領域に照会し得る。例えば、GNN.g7768040__000033__002は、Genscan推定コード配列の識別番号であって、g7768040がGenscan分析によって得られたGenBankの配列の識別番号である。このGenscan推定

コード配列は、配列を組み立てる前に編集する場合がある（例4を参照）。または列5の識別番号は、「エキソンスティッチング(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方からなる群を意味する場合もある。または、列5の識別番号は、「エキソンストレッチング」アルゴリズムによってcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある（実施例5を参照）。例えば、FL5378618_g4416547_g4091819は「ストレッチされた」配列の識別番号である。5378618はIncyteプロジェクト識別番号であり、g4416547は「エクソンストレッチング」アルゴリズムが適用されたヒトゲノム配列のGenBankの識別番号であり、またg4091819は最も近いGenBankタンパク質相同体のGenBankの識別番号である。（実施例5を参照）。場合によっては、列5に示されている配列の範囲と重複するIncyte cDNAの範囲が得られ、最終的なコンセンサスポリヌクレオチド配列が決定されるが、それに相当するIncyte cDNAの識別番号は示されていない。

10

20

30

40

50

【0120】

表5は、Incyte cDNA配列を用いてアセンブルされた完全長ポリヌクレオチド配列のための代表的なcDNAライブラリを示している。代表的なcDNAライブラリは、上記のポリヌクレオチド配列をアセンブル及び確認するために用いられるIncyte cDNA配列によって最も頻繁に代表されるIncyte cDNAライブラリである。cDNAライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0121】

本発明はまた、XMESの変異体も含む。好適なXMESの変異体は、XMESの機能的或いは構造的特徴の少なくともどちらか一方を有し、かつXMESアミノ酸配列に対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、或いは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、更には少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0122】

本発明には、XMESをコードするポリヌクレオチドも含まれる。或る例では、XMESをコードするSEQ ID NO: 10 - 18からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列が本発明に含まれている。SEQ ID NO: 10 - 18のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

【0123】

本発明には、XMESをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列も含まれる。詳細には、このようなポリヌクレオチド配列の変異配列は、XMESをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の特定の実施形態は、SEQ ID NO: 10 - 18からなる一群から選択された核酸配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有するSEQ ID NO: 10 - 18からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列の変異配列を提供する。上記したポリヌクレオチド変異配列は何れも、XMESの機能的或いは構造的特徴の少なくとも1つを有するアミノ酸配列をコードする。

【0124】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るXMESをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組み合わせは、天然のXMESのポリ

ヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【0125】

X M E S をコードするヌクレオチド配列及びその変異配列は一般に、好適に選択されたストリンジェントな条件下で、天然の X M E S のヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、非天然のコドンを含めるなどの実質的に異なった使い方のコドンを有する X M E S 或いはその誘導体をコードするヌクレオチド配列を作ることは有利となり得る。宿主が特定のコードンを利用する頻度に基づいて、特定の真核又は原核宿主に発生するペプチドの発現率を高めるようにコードンを選択することが可能である。コードされたアミノ酸配列を変えないで、X M E S 及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質的に 10
変更する別の理由は、天然の配列から作られる転写物より例えば長い半減期など好ましい特性を備える R N A 転写物を作ることにある。

【0126】

本発明はまた、X M E S 及びその誘導体をコードする D N A 配列またはそれらの断片を完全に合成化学によって作り出すことも含む。作製後、当分野でよく知られている試薬を用いて、この合成配列を任意の様々な入手可能な発現ベクター及び細胞系中に挿入し得る。更に、合成化学を用いて X M E S またはその任意の断片をコードする配列に突然変異を誘導し得る。

【0127】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO: 10 - 18 及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G. M. 及び S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 399 - 407; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152: 507 - 511. を参照)。アニーリング及び洗浄条件を含むハイブリダイゼーションの条件は、「定義」に記載されている。 20

【0128】

DNA シークエンシングの方法は当分野でよく知られており、本発明の何れの実施例も DNA シークエンシング方法を用いて実施可能である。DNA シークエンシング方法には酵素を用いることができ、例えば DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taq ポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性 T7 ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ) を用いることができる。或いは、例えば ELONGASE 増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD) において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB 2200 液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC 200 サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA) 及び ABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) 等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNA シークエンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNA シークエンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) または当分野でよく知られている他の方法を用いてシークエンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する。(Ausubel, F. M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7, Meyers, R. A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856 - 853 ページ等を参照)。 30
40

【0129】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、XMESをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である(Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2: 318-322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限酵素断片から得る(Triglia, T.ら(1988) Nucleic Acids Res 16: 8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に關与している。(Lagerstrom, M.ら(1991) PCR Methods Applic 1: 111-119等を参照)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている。(Parker, J. D.ら(1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055-3060等を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoter Finder(商標)ライブラリ(Clontech, Palo Alto CA)を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア(National Biosciences, Plymouth MN)或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0130】

完全長cDNAをスクリーニングする際は、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択されたライブラリを用いるのが好ましい。更に、ランダムプライマーのライブラリは、しばしば遺伝子の5'領域を有する配列を含み、オリゴd(T)ライブラリが完全長cDNAを作製できない状況に対して好適である。ゲノムライブラリは、5'非転写調節領域への配列の伸長に有用であろう。

【0131】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを用いて、シーケンシングまたはPCR産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。具体的には、キャピラリーシーケンシングは、電気泳動による分離のための流動性ポリマーと、4つの異なるヌクレオチドに特異的であるような、レーザーで活性化される蛍光色素と、放出された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア(Applied Biosystems社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等)を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシーケンシングに特に適している。

【0132】

本発明の別の実施例では、XMESをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を、適切な宿主細胞内でXMES、XMESの断片またはその機能的等価物を発現させるような組換えDNA分子内でクローニングし得る。遺伝暗号固有の宿重に起因して、実質的同一或いは機能的等価のアミノ酸配列をコードするような別のDNA配列を作製してXMESの発現に利用し得る。

【0133】

種々の目的でXMESをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている

方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド仲介定方向突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

【0134】

本発明のヌクレオチドは、Molecular BreedingTM (Maxygen Inc., Santa Clara CA. 米国特許第5,837,458号、Chang, C.-C.ら(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797、Christians, F.C.ら(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264、Cramer, A.ら(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319に記載)等のDNAシャッフリング技術の対象となり、XMESの生物学的特性、例えば生物活性、酵素力、或いは他の分子や化合物との結合力等を変更または向上させ得る。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCR仲介再組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを生成するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。このように、遺伝の多様性は「人為的」品種改良及び急速な分子の進化を経て創生される。例えば、ランダムポイント突然変異を有する単一の遺伝子の断片を組み換えて、スクリーニングし、その後所望の特性が最適化されるまでシャッフリングすることができる。或いは、所定の遺伝子の断片を同種または異種のいずれかから得た同一遺伝子ファミリーの相同遺伝子の断片と組み換えて、それによって天然に存在する複数の遺伝子の遺伝多様性を、指図された制御可能な方法で最大化させることができる。

【0135】

別の実施例によれば、XMESをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である(例えば、Caruthers, M.H.ら(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:215-223; 及びHorn, T.他(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser 7:225-232を参照)。或いは、化学的方法を用いてXMESそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる(Creighton, T. (1984) Proteins, Structures and Molecular Properties, WH Freeman, New York NY, 55-60ページ、Roberge, J.Y.ら(1995) Science 269:202-204等を参照)。自動合成はABI 431Aペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて達成し得る。更にXMESのアミノ酸配列または任意のその一部は、直接的な合成の際の変更、及び/または化学的方法を用いた他のタンパク質または任意のその一部からの配列との組み合わせにより、天然のポリペプチド配列を有するポリペプチドまたは変異体ポリペプチドを作製することが可能である。

【0136】

ペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質上精製可能である(Chiez, R.M. and F.Z. Regnier (1990) Methods Enzymol. 182:392-421等を参照)。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる(前出のCreighton, 28-53ページ等を参照)。

【0137】

生物学的に活性なXMESを発現させるために、XMESをコードするヌクレオチド配列

またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含むベクターである。必要な要素には、ベクター及びX M E Sをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型プロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列がある。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。固有開始シグナルを用いて、X M E Sをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、A T G開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。X M E Sをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのA T G開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルがベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。(Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162.等を参照)。

10

【0138】

当業者によく知られている方法を用いて、X M E Sをコードする配列と、好適な転写及び翻訳調節要素とを含む発現ベクターを構築することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる。(例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16-17章; 及びAusubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9章、13章及び16章を参照)

20

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、X M E Sをコードする配列を保持及び発現し得る。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルスCaMVまたはタバコモザイクウイルスTMV)または細菌発現ベクター(例えばTiまたはpBR322プラスミド)で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある(前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、; Engelhard, E.K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227、Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、Takamatsu, N. (1987) EMBOJ. 6:307-311、; 『マグローヒル科学技術年鑑』(The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191-196ページ、Logan, J. and T. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、Harrington, J.J. ら (1997) Nat. Genet. 15:345-355等を参照)レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる(Di Nicola, M. 他 (1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Yu, M. 他 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、Buller, R.M. 他 (1985) Nature 317(6040):813-815; McGregory

30

40

50

r, D. P. 他 (1994) Mol. Immunol. 31 (3): 219 - 226、Verma, I. M. and N. Somia (1997) Nature 389: 239 - 242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0139】

細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、XMESをコードするポリヌクレオチド配列の使用目的に応じて選択可能である。例えば、XMESをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング及び増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) またはPSPORT1プラスミド (Life Technologies) などの多機能大腸菌ベクターを用いることができる。XMESをコードする配列の、ベクターの多数のクローニング部位への連結反応によって、lacZ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌を同定するための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における*in vitro*転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (Van Heeke, G. 及び S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264: 5503 - 5509. 等を参照) 多量のXMESが必要な場合、例えば抗体を生成する場合などには、XMESの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導SP6バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【0140】

酵母の発現系を使用してXMESを生成し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、酵母菌サッカロミセス-セレビジエまたは*Pichia pastoris*に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む (例えば、Ausubel, 1995, 前出、Bitter, G. A. ら (1987) Methods Enzymol. 153: 516 - 544、及び Scorer, C. A. ら (1994) Bio/Technology 12: 181 - 184. を参照)。

【0141】

植物系を使用してXMESを発現することも可能である。XMESをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独或いはTMV (Takamatsu, N. (1987) EMBO J 6: 307 - 311) 由来のオメガリーダー配列と組み合わせるようなCaMV由来の35S及び19Sプロモーターによって促進される。或いは、RUBISCOの小サブユニット等の植物プロモーターまたは熱ショックプロモーターを用いてもよい。(例えば、Coruzzi, G. ら (1984) EMBO J. 3: 1671 - 1680; Broglie, R. ら (1984) Science 224: 838 - 843; および Winter, J. ら (1991) Results Probl. Cell Differ. 17: 85 - 105を参照) これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である (『マグローヒル科学技術年鑑』 (The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191 - 196ページ等を参照)。

【0142】

哺乳動物細胞においては、多数のウイルスベースの発現系を利用し得る。発現ベクターとしてアデノウイルスを用いる場合、XMESをコードする配列は、後発プロモーター及び3連リーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体に連結反応され得る。非必須のE1またはE3領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でXMESを発現する感染ウイルスを得ることが可能である。(Logan, J. 及び Shenk, T. (1

10

20

30

40

50

984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659を参照)更に、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサー等の転写エンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞における発現を増大させ得る。SV40またはEBVをベースにしたベクターを用いてタンパク質を高レベルで発現させることもできる。

【0143】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療のために約6kb~10MbのHACsを作製し、従来の輸送方法(リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル)で供給する(Harrington, J. J. 他(1997) *Nat Genet.* 15:345-355.等を参照)。

10

【0144】

長期にわたり哺乳動物系内で組換えタンパク質を生成するためには、細胞株内のXME Sの安定発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内在性発現因子、或いはその両者のウイルス起源を含むものと、同一或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、XME Sをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能である。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約1~2日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

20

【0145】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、tk^r単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、apr^r細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある(例えば、Wigler, M. 他(1977) *Cell* 11:223-232; 及びLowy, I. 他(1980) *Cell* 22:817-823を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばdhfrはメトトレキサートに対する耐性を与え、neoはアミノグリコシッドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与え、alsはクロルスルフロンに対する耐性を、patはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える(Wigler, M. ら(1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. ら(1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14等を参照)。この他の選択可能遺伝子、例えば、代謝のための細胞要求を変えるtrpB及びhisDは、文献に記載されている。(Hartman, S. C. and R. C. Mulligan(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051等を参照)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質(GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である(Rhodes, C. A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131等を参照)。

30

40

【0146】

マーカー遺伝子発現の存在/不存在によって目的の遺伝子の存在が示唆されても、その遺伝子の存在及び発現の確認が必要な場合もある。例えば、XME Sをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、XME Sをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または単一プロモーター制御下で、XME Sをコードする配列とタンデムにマーカー遺伝子を配置することも可能である。誘導または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は通常、タンデム遺伝子の発現も示す。

50

【0147】

一般に、X M E S をコードする核酸配列を含み且つX M E S を発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、D N A - D N A 或いはD N A - R N A ハイブリダイゼーション、P C R法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術がある。

【0148】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてX M E S の発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ(E L I S A)、ラジオイムノアッセイ(R I A)、蛍光活性化細胞選別(F A C S)などが挙げられる。X M E S 上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイ(*two-site, monoclonal-based immunoassay*)が好ましいが、競合結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である(Hampton, R. ら(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV, Coligan, J. E. ら(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY, Pound, J. D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

【0149】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。X M E S をコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションプローブ或いはP C Rプローブを産出する方法には、オリゴ標識化、ニックトランスレーション、末端標識化、または標識されたヌクレオチドを用いるP C R法がある。或いは、X M E S をコードする配列またはその任意の断片を、m R N A プローブを産出するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T 7、T 3またはS P 6等の好適なR N A ポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでR N A プローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega (Madison WI)、U. S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

【0150】

X M E S をコードするヌクレオチド配列を用いて形質転換した宿主細胞は、細胞培地からのタンパク質の回収及び発現に適した条件下で培養し得る。形質転換細胞から製造されたタンパク質が分泌されるか細胞内に留まるかは、使用される配列、ベクター、或いはその両者に依存する。当業者であれば理解し得るように、X M E S をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、原核細胞膜または真核細胞膜を透過するX M E S の直接分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計し得る。

【0151】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後

10

20

30

40

50

処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等）は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするように選択し得る。

【0152】

本発明の別の実施例では、XMES をコードする天然の核酸配列、修飾核酸配列または組換え核酸配列を、上記任意の宿主系において融合タンパク質の翻訳をもたらす異種配列に連結反応させることができる。例えば、市販されている抗体を用いて認識可能な異種部分を含むキメラXMES タンパク質は、XMES 活性阻害剤に対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、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 (MBP)、チオレドキシン (Trx)、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素 (HA) がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素 (HA) は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、融合タンパク質を遺伝子操作し、XMES が精製後に異種部分から切断され得るように、XMES コード配列と異種タンパク質配列の間にタンパク質分解性開裂部位を含めることもできる。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel (1995) 10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

10

20

【0153】

本発明の更に別の実施例では、TNTウサギ網状赤血球可溶化液またはコムギ胚芽抽出系 (Promega) を用いて、放射能標識したXMES の合成が *in vitro* で可能である。これらの系は、T7、T3またはSP6プロモーターと機能的に結合したタンパク質コード配列の転写及び翻訳を結合する。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

30

【0154】

本発明のXMESまたはその断片を用いて、XMESに特異結合する化合物をスクリーニングすることができる。少なくとも1つまたは複数の試験化合物を用いて、XMESへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質（例えば受容体）または小分子が挙げられる。

【0155】

一実施例では、このように同定された化合物は、例えばリガンドやその断片などのXMESの天然のリガンド、または天然の基質、構造的または機能的な擬態性または自然結合パートナーに密接に関連している (Coligan, J. E. 他 (1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、XMES が結合する天然受容体、或いは例えばリガンド結合部位などの少なくとも受容体のある断片に密接に関連し得る。何れの場合も、既知の技術を用いてこの化合物を合理的に設計することができる。一実施例では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質或いは細胞膜上のタンパク質の何れか一方としてXMESを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエあるいは大腸菌からの細胞が含まれる。XMES を発現する細胞またはXMES を含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、XMES または化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

40

50

【0156】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、蛍光色素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたXME Sと結合させるステップと、XME Sとこの化合物との結合を検出するステップを含み得る。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、無細胞再構成標本、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

【0157】

本発明のXME S またはその断片を用いて、XME S の活性を調整する化合物をスクリーニングすることが可能である。このような化合物には、アゴニスト、アンタゴニスト、或るいは部分的または逆アゴニスト等が含まれる。一実施例では、XME Sが少なくとも1つの試験化合物と結合する、XME Sの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、試験化合物の存在下でのXME Sの活性が試験化合物不在下でのXME Sの活性と比較する。試験化合物の存在下でのXME Sの活性の変化は、XME Sの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をXME Sの活性に適した条件下でXME Sを含む *in vitro* または細胞遊離系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、XME Sの活性を調整する試験化合物は間接的に結合することが可能であり、試験化合物と直接接触する必要がない。少なくとも1つから複数の試験化合物をスクリーニングすることができる。

【0158】

別の実施例では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、XME Sまたはその哺乳動物相同体をコードするポリヌクレオチドを「ロックアウト」する。このような技術は当技術分野において周知であり、ヒト疾患動物モデルの作製に有用である（米国特許第5,175,383号及び第5,767,337号等を参照）。例えば129/SvJ細胞株等のマウスES細胞は初期のマウス胚に由来し、培地で増殖させることができる。このES細胞は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子（*neo: Capecchi, M. R. (1989) Science 244: 1288-1292*）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Cre-loxP系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をロックアウトする（*Marth, J. D. (1996) Clin. Invest. 97: 1999-2002; Wagner, K. U. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25: 4323-4330*）。形質転換したES細胞を同定し、例えばC57BL/6マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、可能性のある治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【0159】

XME Sをコードするポリヌクレオチドを *in vitro* でヒト胚盤胞由来のES細胞において操作することが可能である。ヒトES細胞は、内胚葉、中胚葉及び外胚葉の細胞の種類を含む少なくとも8つの別々の細胞系統に分化する可能性を有する。これらの細胞系統は、例えば神経細胞、造血系統及び心筋細胞に分化する（*Thomson, J. A. 他 (1998) Science 282: 1145-1147*）。

【0160】

XME S をコードするポリヌクレオチドを用いて、ヒト疾患をモデルとした「ノックイン」ヒト化動物（ブタ）または遺伝子組換え動物（マウスまたはラット）を作製することが可能である。ノックイン技術を用いて、XME Sをコードするポリヌクレオチドの或る領域を動物ES細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換

10

20

30

40

50

細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、可能性のある医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばXMESを乳汁内に分泌するなどXMESを過剰に発現する哺乳動物近交系は、便利なタンパク質源となり得る(Janne, J. 他(1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74)。

【0161】

(治療)

XMESのある領域と細胞外メッセンジャーのある領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的及び構造的類似性が存在する。更にXMESの発現は、軟骨及び神経組織、脳、乳房、肝臓、前立腺からの腫瘍組織と密接に関連する。従って、XMESは、神経の疾患、自己免疫/炎症の疾患、発生または発達障害、内分泌障害および癌を含む細胞増殖異常においてある役割を果たすと考えられる。XMESの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、XMESの発現または活性を低下させることが望ましい。また、XMESの発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、XMESの発現または活性を増大させることが望ましい。

10

【0162】

従って、或る実施例において、XMESの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にXMESまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患として神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病(クールー、クロイツフェルトヤコブ病、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫(cerebellorretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系の精神薄弱及び他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病(気分性、不安性の障害、分裂病性疾患)、季節性障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症(corticobasal degeneration)、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれる。また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス

20

30

40

50

マジェニス症候群 (Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham 舞蹈病 (Sydenham's chorea) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれる。内分泌障害の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンド シュラークリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン (ADH) 分泌症候群 (SIADH) 及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎 (橋本病)、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレーブス病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn 病 (chronic hypercalcemia) を含む副甲状腺機能亢進症と、I 型及び II 型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon 症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全 (isolated gonadotropin deficiency)、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 - 還元酵素症候群、21 ヒドロキシラーゼ症候群、女性乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれる。細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病 (MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。

【0163】

別の実施例では、XMES またはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む XMES の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0164】

更に別の実施例では、実質的に精製された XMES を含む成分を好適な医薬用担体と共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む XMES の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0165】

更に別の実施例では、XMES の活性を調節するアゴニストを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む XMES の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0166】

更に別の実施例では、患者に XMES のアンタゴニストを投与して、XMES の発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した神経の疾患、自己免疫 / 炎症の疾患、発生または発達障害、内分泌障害および癌を含む細胞増殖異常が含まれる。一実施態様においては、アンタゴニストとして直接的に、或いは XMES を発現する細胞または組織に薬剤を

輸送するターゲティングまたは輸送機構として間接的にX M E Sと特異結合する抗体を用いることができる。

【0167】

別の実施例では、X M E Sをコードするポリヌクレオチドの相補体を発現するベクターを患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含むX M E Sの発現または活性の増大に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【0168】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来 of 医薬原理に従ってを選択し得る。治療薬と組み合わせることにより、上記した種々の疾患の治療または予防に相乗効果をもたらし得る。この方法を用いることにより少量の各薬剤で医薬効果をあげることが可能となり、それによって副作用の可能性を低減し得る。

10

【0169】

X M E Sのアンタゴニストは、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造し得る。具体的には、精製されたX M E Sを用いて抗体を作るか、治療薬のライブラリをスクリーニングして、X M E Sと特異結合するものを同定することが可能である。X M E Sの抗体も、本技術分野で一般的に知られている方法を用いて製造することが可能である。

限定するものではないがこのような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、F a b断片及びF a b発現ライブラリによって作られた断片が含まれ得る。中和抗体（即ち二量体の形成を阻害する抗体）は通常、治療用に好適である。

20

【0170】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主は、X M E S、またはX M E Sの任意の断片またはオリゴペプチドであって免疫抗原性の特性を有するものを注入することによって免疫化することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤と

30

がある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、B C G（カルメット ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム パルヴムが特に好ましい。

【0171】

X M E Sに対する抗体を誘導するために用いるオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、少なくとも約5のアミノ酸からなり、一般的には少なくとも約10のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有するものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。X M E Sアミノ酸の短い伸長部は、別のタンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシニアンの配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

40

【0172】

X M E Sに対するモノクローナル抗体は、抗体分子を産生する任意の技術を用いて、培地内の連続した細胞株によって作製し得る。限定するものではないがこのような技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術及びE B V - ハイブリドーマ技術がある（Kohler, G. ら. (1975) Nature 256: 495 - 497、Kozbor, D. ら (1985) J. Immunol. Methods 81: 31 - 42、Cote, R. J. ら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026 - 2030、Cole, S. P. ら (1984) Mol. Cell Biol. 62: 109 - 120等を参照）。

【0173】

50

更に、「キメラ抗体」を作製するために開発した技術、例えば好適な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることが可能である (Morrisson, S. L. ら (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855、Neuberger, M. S. ら (1984) Nature 312: 604 - 608、タケダ, S. ら (1985) Nature 314: 452 - 454等を参照)。或いは、一本鎖抗体を産生するために説明された技術を適用し、本技術分野で知られている方法を用いて、X M E S 特異性一本鎖抗体を産生し得る。関連特異性を有するガイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる (Burton D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10134 - 10137等を参照)。

10

【0174】

抗体の産生は、リンパ球集団における *in vivo* 産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る (Orlandi, R. ら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833 - 3837、Winter, G. ら (1991) Nature 349: 293 - 299等を参照)。

【0175】

X M E S のための特異結合部位を有する抗体を産生することもできる。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製される $F(ab')_2$ 断片と、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製される Fab 断片とがある。或いは、Fab 発現ライブラリを作製することによって、モノクローナル Fab 断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる (Huse, W. D. ら (1989) Science 246: 1275 - 1281等を参照)。

20

【0176】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる免疫放射線アッセイまたは競合結合アッセイに対する数々のプロトコルは、本技術分野において公知である。このようなイムノアッセイは通常、X M E S とその特異性抗体間の複合体形成の計測に關与している。2つの非干渉性 X M E S エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してよい (前出の Pound の文献)。

30

【0177】

ラジオイムノアッセイ技術と共に様々な方法、例えばスキヤッチャード分析を用いて、X M E S に対する抗体の親和性を評価する。親和性は結合定数 K_a で表す。 K_a は、平衡状態において X M E S 抗体複合体のモル濃度を遊離抗体と遊離抗原のモル濃度で除した値であると定義する。ポリクローナル抗体は多様な X M E S エピトープに対する親和性が不均一であり、ポリクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、X M E S 抗体の平均親和性または結合活性を表す。モノクローナル抗体は特定の X M E S エピトープに対して単一特異的であり、モノクローナル抗体試薬のために決定した K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が約 $10^9 \sim 10^{12}$ L/mol の範囲にあるような高親和性抗体試薬は、X M E S 抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a 値が $10^6 \sim 10^7$ L/mol の低親和性抗体試薬は、X M E S が抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製 (immunopurification) 及び類似の処理に用いるのが好ましい。 (Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach .

40

50

IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

【0178】

ポリクローナル抗体試薬の抗体価及び結合活性を更に評価して、或る下流の適用例に対するこのような試薬の品質及び適性を決定することができる。例えば、少なくとも1~2mg/ml、好ましくは5~10mg/mlの特異抗体を含むポリクローナル抗体試薬は、XMES抗体複合体を沈殿させる必要がある処理において通常用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。(前出のCattyの文献、同Coliganらの文献等を参照)。

10

【0179】

本発明の別の実施例では、XMESをコードするポリヌクレオチド、XMESの任意の断片または相補配列を治療目的で使用することができる。ある実施態様では、XMESをコードする遺伝子のコーディング領域や調節領域に相補的な配列やアンチセンス分子(DNA及びRNA、PNAあるいは修飾ヌクレオチド)を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、XMESをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である。(Agrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJ等を参照。)

20

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である(Slater, J.E.ら(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475及びScanlon, K.J.ら(1995)9(13):1288-1296.等を参照)アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(Miller, A.D.(1990) Blood 76:271、前出のAusubel, Uckert, W. and W. Walther(1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347等を参照)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他の系が含まれる(Rossi, J.J.(1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R.J.ら(1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315、Morris, M.C.ら(1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736.等を参照)。

30

【0180】

本発明の別の実施例では、XMESをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、(i)遺伝子欠損症(例えばX染色体鎖遺伝(Cavazzana-Calvo, M.ら(2000) Science 288:669-672)により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損(SCID)-X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損(Blaese, R.M.ら(1995) Science 270:475-480、Bordignon, C.ら(1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J.ら(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G.ら(1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666、Crystal, R.G.ら(1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア

40

50

(*thalassaemia*)、家族性高コレステロール血症、第VII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病(Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410、Verma, I.M. and Somia, N. (1997) *Nature* 389:239-242)を治療し、(ii)条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii)細胞内の寄生虫(例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)(Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396、Poeschl, E.ら(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス(HBV、HCV)、*Candida albicans*及び*Paracoccidioides brasiliensis*等の真菌寄生虫、並びに*Plasmodium falciparum*及び*Trypanosoma cruzi*等の原虫寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。XMESの発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を発生させる場合、形質導入した細胞の好適な集団からXMESを発現することにより、遺伝子欠損に起因する症状の発現を緩和し得る。

10

【0181】

本発明の更なる実施例では、XMESをコードする哺乳動物発現ベクターを作製し、これらのベクターを機械的手段によってXMES欠損細胞に導入することによって、XMESの欠損による疾患や異常症を治療する。*in vivo*或いは*ex vitro*の細胞に用いる機械的導入技術には、(i)個々の細胞内への直接的なDNA微量注射法、(ii)弾道的金粒子の打ち込み(*ballistic gold particle delivery*)、(iii)リポソーム仲介形質移入、(iv)受容体仲介遺伝子導入、及び(v)DNAトランスポソンの使用(Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217、Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510; Boulay, J-L. and H. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450)がある。

20

【0182】

限定するものではないがXMESの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、PCDNA3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター(Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV(Stratagene, La Jolla CA)及びPTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG(Clontech, Palo Alto CA)がある。XMESを発現させるために、(i)恒常的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは -アクチン遺伝子等)、(ii)誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. and H. Bujard (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5547-5551; Gossen, M. 他(1995) *Science* 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456))、エクジソン誘導性プロモーター(市販されているプラスミドPVGRXR及びPINDに含まれている:Invitrogen)、FK506/ラパマイシン誘導性プロモーター、またはRU486/ミフェプリストーン誘導性プロモーター(Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 前出)、または(iii)正常な個体に由来するXMESをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

30

40

【0183】

市販のリポソーム形質転換キット(例えばInvitrogen社のPerfect L

50

ipid Transfection Kit)を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法(Graham, F. L. and A. J. Eb (1973) *Virology* 52: 456 - 467)若しくは電気穿孔法(Neumann, B. ら (1982) *EMBO J.* 1: 841 - 845)を用いて形質転換を行う。初代細胞にDNAを導入するためには、標準化された哺乳動物の形質移入プロトコルの修飾が必要である。

【0184】

本発明の別の実施例では、XME Sの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でXME Sをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加レトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター(例えばPFB及びPFBNEO)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. ら (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 6733 - 6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞系(VPCL)において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンペロープ遺伝子またはVSVg等の乱交雑エンペロープタンパク質を発現する(Armentano, D. ら (1987) *J. Virol.* 61: 1647 - 1650、Bender, M. A. ら (1987) *J. Virol.* 61: 1639 - 1646、Adam, M. A. and A. D. Miller (1988) *J. Virol.* 62: 3802 - 3806、Dull, T. ら (1998) *J. Virol.* 72: 8463 - 8471、Zufferey, R. ら (1998) *J. Virol.* 72: 9873 - 9880)。Riggに付与された米国特許第5,910,434号("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant")は、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法について開示しており、これを引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団(例えばCD4⁺T細胞)の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている(Ranga, U. ら (1997) *J. Virol.* 71: 7020 - 7029、Bauer, G. ら (1997) *Blood* 89: 2259 - 2267、Bonyhadi, M. L. (1997) *J. Virol.* 71: 4707 - 4716、Ranga, U. ら (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1201 - 1206、Su, L. (1997) *Blood* 89: 2283 - 2290)。

【0185】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の輸送系を用いて、XME Sの発現に関連する1つ若しくは複数の遺伝子異常を有するような細胞にXME Sをコードするポリヌクレオチドを輸送する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島内に導入するために可変性であることが証明された(Csete, M. E. ら (1995) *Transplantation* 27: 263 - 268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号("Adenovirus vectors for gene therapy")に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P. A. ら (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19: 511 - 544 及び Verm 40 50

a, I. M. and N. Somia (1997) Nature 18:389:239-242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

【0186】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の輸送系を用いて、XME Sの発現に関連する1つ若しくは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にXME Sをコードするポリヌクレオチドを輸送する。HSVが向性を有するような中枢神経系の細胞にXME Sを導入する際には、単純ヘルペスウイルス(HSV)系のベクターの使用は特に役立つ。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス(HSV) I型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた(Liu, X. ら (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-1ウイルスベクターの作製についても、DeLucaに付与された米国特許第5,804,413号("Herpes simplex virus swains for gene transfer")に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第5,804,413号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも1つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えHSV d92についての記載がある。上記特許はまた、ICP4、ICP27及びICP22のために除去される組換えHSV系統の作製及び使用について開示している。HSVベクターについては、Goins, W. F. ら (1999) J. Virol. 73:519-532及びXu, H. ら (1994) Dev. Biol. 163:152-161も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの継代、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【0187】

別法では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてXME Sをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に輸送する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス(Semliki Forest Virus, SFV)の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがSFVゲノムに基づいていることが分かった(Garoff, H. and K.-J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスカプシドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノムRNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性(例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ)を有するウイルスタンパク質に比べてキャプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、XME Sに対するコード配列をカプシドコード領域のウイルスゲノムに導入することにより、ベクター導入細胞において多数のXME SコードRNAが産生され、高レベルのXME Sが合成される。通常はウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス(SIN)の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞(BHK-21)の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している(Dryga, S. A. ら (1997) Virology 228:74-83)。ウイルスの宿主の範囲が広いことにより、様々な細胞タイプへのXME Sの導入が可能になる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0188】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約-10と約+10の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポ

リメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんDNAを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある(Gee, J. E. ら (1994) in: Huber, B. E. 及び B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 163-177ページ等を参照)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0189】

リボザイムは酵素性RNA分子であり、RNAの特異的切断を触媒するためにリボザイムを用いることもできる。リボザイム作用のメカニズムは、ヌクレオチド鎖切断に先立つ相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異性ハイブリダイゼーションに参与している。例えば、組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子は、XMESをコードする配列の内ヌクレオチド結合分解性鎖切断を特異的且つ効果的に触媒する。 10

【0190】

任意の潜在的RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたりボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、オリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴に対して切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する15~20リボヌクレオチドの短いRNA配列を、評価することが可能になる。候補標的の適合性の評価も、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの実施容易性をテストすることによって行うことができる。 20

【0191】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相ホスホラミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、XMESをコードするDNA配列の*in vitro*及び*in vivo*転写によってRNA分子を産出し得る。このようなDNA配列は、T7やSP6等の好適なRNAポリメラーゼプロモーターを用いて多様なベクター内に組み入れることが可能である。或いは、相補的RNAを構成的或いは誘導的に合成するようなこれらcDNA産物を、細胞系、細胞または組織内に導入することができる。 30

【0192】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の5'末端、3'末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホチオネートまたは2' Oメチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、PNAの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内在性エンドヌクレアーゼによって容易には認識されないアデニン、シチジン、グアニン、チミン、及びウリジンにアセチル-、メチル-、チオ-及び同様の修飾をしたものに加えて、非従来型塩基、例えばイノシン、クエオシン(queosine)、ワイプトシン(wybutosine)等を包含することによる。 40

【0193】

本発明の追加実施例は、XMESをコードするポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物には、オリゴヌクレオチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、三重らせん形成オリゴヌクレオチド、転写因子その他のポリペプチド転写制御因子、及び特異ポリヌクレオチド配列と相互作用し得る非高分子化学的実体がある。有効な化合物は、ポリヌクレオチド発現のインヒビターまたはエンハンサーのいずれかとして作用することによりポリヌクレオチド発現を変異し得る。従って、XMESの発現または活性の増加に関連する疾患の治療においては、XMESをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的 50

に阻害する化合物が治療上有用であり、X M E S の発現または活性の低下に関連する疾患の治療においては、X M E S をコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に促進する化合物が治療上有用であり得る。

【0194】

特異ポリヌクレオチドの変異発現における有効性に対して、少なくとも1個から複数個の試験化合物をスクリーニングし得る。試験化合物は、当分野で通常知られている任意の方法により得られる。このような方法には、ポリヌクレオチドの発現を変異させる場合と、既存の、市販のまたは専売の、天然または非天然の化合物ライブラリから選択する場合と、標的ポリヌクレオチドの化学的及び/または構造的特性に基づく化合物を合理的にデザインする場合と、組合せ的にまたは無作為に生成した化合物のライブラリから選択する場合に有効であることが知られているような化合物の化学修飾がある。X M E S をコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝され、このように得られる。サンプルには例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、in vitro 細胞遊離系または再構成生化学系があり得る。X M E S をコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、X M E S をコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1つ若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば Schizosaccharomyces pombe 遺伝子発現系 (Atkins, D. ら (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. ら (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: E15) または HeLa 細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. ら (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 8-13) を用いてスクリーニングを実行する。本発明の特定の実施例は、特異的ポリヌクレオチド配列に対するアンチセンス活性のためのオリゴヌクレオチド (デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ペプチド核酸、修飾オリゴヌクレオチド) の組み合わせライブラリをスクリーニングすることに関与している (Bruice, T.W. ら (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. ら (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0195】

ベクターを細胞または組織に導入する多数の方法が利用可能であり、in vivo、in vitro 及び ex vivo の使用に対して同程度に適している。ex vivo 治療の場合、ベクターを患者から採取した幹細胞内に導入し、クローニング増殖して同一患者に自家移植で戻すことができる。トランスフェクション、リボソーム注入またはポリカチオンアミノポリマーによる輸送は、当分野でよく知られている方法を用いて実行することができる。(Goldman, C.K. ら (1997) *Nat. Biotechnol.* 15: 462-466. 等を参照)。

【0196】

上記の治療方法はいずれも、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル等の哺乳動物を含めて治療が必要な全ての対象に適用できる。

【0197】

本発明の追加実施例は、通常薬剤として許容できる賦形剤で処方される活性成分を有する成分の投与に関連する。賦形剤には例えば、糖、でんぷん、セルロース、ゴム及びタンパク質がある。様々な処方通常知られており、詳細は Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような成分は、X M E S、X M E S に対する抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、または X M E S インヒビターから構成し

10

20

30

40

50

得る。

【0198】

本発明に用いられる成分は、任意の数の経路によって投与することができ、限定するものではないが経路には、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、クモ膜下腔内、心室内、肺、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸がある。

【0199】

肺から投与する成分は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような医薬品成分は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば伝統的な低分子重量有機薬）の場合には、速効製剤のエアロゾル輸送は当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺輸送が最近向上したことにより、インスリン等の薬剤を実質的に血液循環へ輸送することを可能にした（Patton, J. S. ら, 米国特許第5,997,848号等を参照）。肺輸送は、針注射なしに投与する点で優れており、潜在的に有毒な浸透エンハンサーの必要性をなくす。

10

【0200】

本発明での使用に適した成分には、所定の目的を達成するために必要なだけの量の活性成分を含有する成分が含まれる。有効投与量の決定は、当業者の能力の範囲内で行う。

【0201】

特殊形状の成分は、X M E S またはその断片を含む高分子を直接細胞内輸送するために調製される。例えば、細胞不透過性高分子を含むリポソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内輸送を促進し得る。或いは、X M E S またはその断片をH I V T a t - 1 タンパク質から陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている（Schwarze, S. R. ら (1999) Science 285: 1569 - 1572）。

20

【0202】

任意の化合物に対して、細胞培養アッセイ、例えば新生物性細胞の細胞培養アッセイにおいて、或いは、動物モデル、例えばマウス、ウサギ、イヌまたはブタ等において、先ず治療の有効投与量を推定することができる。動物モデルはまた、好適な濃度範囲及び投与経路を決定するためにも用い得る。このような情報を用いて、次にヒトに対する有益な投与量及び投与経路を決定することができる。

30

【0203】

治療上の有効投与量は、症状や容態を回復させるような活性分量を参考にする。そのような活性成分の例としては、X M E S またはその断片、X M E S の抗体、X M E S のアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターがある。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばE D₅₀（集団の50%の医薬的有效量）またはL D₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の治療効果に対する投与量の比は、治療指数であり、L D₅₀ / E D₅₀ 比として表すことができる。高い治療指数を示すような成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、E D₅₀ を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

40

【0204】

正確な投与量は、治療が必要な被験者に関する要素を考慮して、現場の医者が決定することになる。効果的なレベルの活性成分を与え、或いは所望の効果を維持するべく、投与量及び投与を調節する。被験者に関する要素としては、疾患の重症度、患者の通常健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い成分は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る

50

。

【0205】

通常の投与量は、投与の経路にもよるが約0.1～100,000 μ gであり、合計で約1gまでとする。特定の投与量及び輸送方法に関するガイダンスは文献に記載されており、現場の医者は通常それを利用することができる。当業者は、タンパク質またはインヒビターに対する処方とは異なる、ヌクレオチドに対する処方を利用することになる。同様に、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの輸送は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。

【0206】

(診断)

別の実施例では、XME Sの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはXME SやXME Sのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、XME Sを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。XME Sの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてXME Sを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

【0207】

XME Sを測定するための様々なプロトコル、例えばELISA、RIA、FACS等が本技術分野において知られており、XME S発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。正常或いは標準的なXME Sの発現の値は、複合体の形成に適した条件下で、正常な哺乳動物、例えばヒトなどの被験者から採取した体液または細胞とXME Sに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。対象内で発現したXME Sの量、対照、検体からの病変サンプルを標準値と比較する。標準値と対象との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【0208】

本発明の別の実施例によれば、XME Sをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、検体におけるXME Sの発現が疾患と相関し得るような該検体における遺伝子発現の検出及び定量に用いることができる。診断アッセイは、XME Sの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にXME Sレベルの調製をモニターするために用いることができる。

【0209】

ある実施形態では、XME Sをコードする核酸配列を同定するために、XME Sまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブとのハイブリダイゼーションを用いることができる。プローブが同定するのはXME S、突然変異体または関連配列をコードするような、天然に存在する配列のみであるか否かは、プローブの特異性及びハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェンシーによって決定されることになる。ここで、プローブの特異性とは、プローブが高特異領域(例えば5'調節領域)からなるのか、低特異領域(例えば保存されたモチーフ)からなるのかということである。

【0210】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はXME Sをコードする任意の配列と少なくとも50%の相同性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO: 10-18の配列、或いはXME S遺伝子のプロモーター、エンハンサー、イントロンを含むゲノム配列に由来し得る。

10

20

30

40

50

【0211】

X M E S をコードする D N A に対する特異的ハイブリダイゼーションプローブを作製する方法には、X M E S または X M E S 誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、m R N A プローブを作製するためのベクターにクローニングする方法が含まれる。m R N A プローブ作製のためのベクターは、当業者に知られており、市販されており、好適な R N A ポリメラーゼ及び好適な標識されたヌクレオチドを加えることによって、i n v i t r o で R N A プローブを合成するために用いられ得る。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のレポーターの集団によって標識され得る。レポーター集団の例としては、³²P または ³⁵S 等の放射性核種、或いはアビジン/ビオチン結合系を介してプローブに結合されたアルカリホスファターゼ等の酵素標識などが挙げられる。

10

【0212】

X M E S をコードするポリヌクレオチド配列は、X M E S の発現に係る疾患の診断の為に用い得る。限定するものではないが、このような疾患として神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、及び G e r s t m a n n - S t r a u s s l e r - S c h e i n k e r 症候群を含む）、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫（c e r e b e l l o r e t i n a l h e m a n g i o b l a s t o m a t o s i s）、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系の精神薄弱及び他の発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病（気分性、不安性の障害、分裂病性疾患）、季節性障害（S A D）、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、皮質基底核変性症（c o r t i c o b a s a l d e g e n e r a t i o n）、家族性前頭側頭骨痴呆が含まれる。また自己免疫/炎症疾患も含まれ、その中には後天性免疫不全症候群（A I D S）、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫多発性内分泌腺障害症（A P E C E D）、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー性皮膚炎、皮膚筋炎、糖尿病、気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜の炎症、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、リウマチ様関節炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性紅斑性狼瘡、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、ウェルナー症候群、癌の合併症、血液透析、体外循環、ウイルス性感染症、細菌性感染症、真菌性感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫の感染症及び外傷が含まれる。発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、W A G R 症候群（ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱）、スミス マジェニス症候群（S m i t h - M a g e n i s s y n d r o m e）、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツー ス病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、S y n d e n h a m 舞蹈病（S y n d e n h a m ' s c h o r e a）及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれる。内分泌障害の中には原発脳腫瘍及び腺腫、妊娠性梗塞、下垂体切除、動脈瘤、血

20

30

40

50

管奇形、血栓症、感染症、免疫異常、頭部外傷による合併症などの病変から起こる視床下部及び下垂体の障害と、性機能低下及びシーハン症候群、尿崩症、カルマン病、ハンドシュラークリスチャン病、レトラ シヴェ病、サルコイドーシス、エンブティセラ症候群、小人症を含む下垂体低下に関連した障害と、良性線種によって発生しやすい不适当抗利尿ホルモン（ADH）分泌症候群（SIADH）及び先端巨大症、巨人症を含む下垂体亢進に関連した障害と、甲状腺腫及び粘液水腫、細菌感染性急性甲状腺炎、ウイルス感染性亜急性甲状腺炎、自己免疫性甲状腺炎（橋本病）、クレチン病を含む甲状腺機能低下症に関連した障害と、甲状腺中毒症及びその様々な型、グレース病、前脛骨粘液水腫、中毒性多結節性甲状腺腫、甲状腺癌、プランマー病を含む甲状腺機能亢進症と、Conn病（chronic hypercalcemia）を含む副甲状腺機能亢進症と、I型及びII型糖尿病及び合併症などの膵臓疾患と、過形成及び副腎皮質の癌腫や腺腫、アルカローシスに関連した高血圧、アミロイド症、低カリウム血、クッシング病、リドル症候群、Arnold-Healy-Gordon症候群、褐色細胞腫瘍、アジソン病、副腎機能不全などの副腎に関連した障害と、女性の異常プロラクチン産生及び不妊症、子宮内膜症、月経周期の摂動、多嚢胞性卵巣疾患、高プロラクチン血症、選択的性腺刺激ホルモン不全（isolated gonadotropin deficiency）、無月経、乳汁漏出症、半陰陽、多毛症及び男性化、乳癌、閉経期後の骨粗鬆症、男性のライジッヒ細胞過形成、男性更年期、生殖細胞無形成症、ライジッヒ細胞腫瘍に関連した性機能亢進、アンドロゲン受容体の欠如に関連したアンドロゲン耐性、5 α -還元酵素症候群、21ヒドロキシラーゼ症候群、女性乳房症などの生殖腺ステロイドホルモンに関連した疾患とが含まれる。細胞増殖異常の中には日光性角化症及びアテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病（MCTD）、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。XMESをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットプロット法やその他の膜ベースの技術と、PCR法と、ディップスティック（dipstick）法、ピン及びマルチフォーマットELISA様アッセイと、変異XMESの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【0213】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、XMESをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。XMESをコードするヌクレオチド配列は標準法で標識化され、ハイブリダイゼーション複合体の形成に好適な条件下で、患者から採取した体液または組織のサンプルに添加することができる。好適なインキュベーション期間が経過したらサンプルを洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。患者サンプルのシグナル量が対照サンプルと比べて著しく変化している場合は、サンプル内のXMESをコードするヌクレオチド配列の変異レベルは関連する疾患の存在を示している。このようなアッセイは、動物実験、臨床試験における特定の治療効果を推定するため、或いは個々の患者の治療をモニターするために用いることもできる。

【0214】

XMESの発現に関連する疾患の診断基準を提供するために、発現のための正常あるいは標準概要を確立する。これは、ハイブリダイゼーション或いは増幅に好適な条件下で、動物或いはヒトの正常な対象から抽出した体液或いは細胞を、XMESをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

【0215】

疾患の存在が確定されて治療プロトコルが開始されると、患者の発現レベルが正常な被検者に観察されるレベルに近づき始めたかどうかを測定するため、ハイブリダイゼーションアッセイを通常ベースで繰り返し得る。連続アッセイから得られた結果を用いて、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0216】

癌に関しては、個体からの生体組織における異常な量の転写物（過少発現または過剰発現）の存在は、疾患の発生素質を示したり、実際に臨床的症狀が現れる前に疾患を検出する方法を提供したりし得る。この種のより明確な診断により、医療の専門家が予防方法または積極的な治療法を早くから利用し、それによって癌の発生または更なる進行を防止することが可能となる。

10

【0217】

X M E S をコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドを追加的に診断上利用することは、P C R の利用に關与し得る。これらのオリゴマーは、化学的に合成するか、酵素により生産するか、或いは *i n v i t r o* で産出し得る。オリゴマーは、好ましくは X M E S をコードするポリヌクレオチドの断片、或いは X M E S をコードするポリヌクレオチドと相補的ポリヌクレオチドの断片を含み、最適条件下で特定の遺伝子や条件を識別するべく利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁の D N A 或いは R N A 配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0218】

或る態様において、X M E S をコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて単一ヌクレオチド多形性 (S N P) を検出し得る。S N P は、多くの場合にヒトの先天性または後天性遺伝病の原因となるような置換、挿入及び欠失である。限定するものではないが S N P の検出方法には、制限酵素切断法 (S S C P) 及び蛍光 S S C P (f S S C P) がある。S S C P では、X M E S をコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (P C R) を用いた D N A の増幅を行う。D N A は例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。D N A 内の S N P は、一本鎖形状の P C R 生成物の 2 次及び 3 次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。f S S C P では、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによって D N A シークエンシング機などのハイスループット機器でアンプリマー (a m p l i m e r) の検出が可能になる。更に、インシリコ S N P (*i n s i l i c o* S N P , *i s* S N P) と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳する D N A 断片の配列を比較することにより、多形性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、D N A の実験室での調整及び統計モデル及び D N A 配列クロマトグラムの自動分析を用いたシークエンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えばハイスループット M A S S A R R A Y システム (S e q u e n o m , I n c . , S a n D i e g o C A) を用いた質量分析により S N P を検出し、特徴付ける。

20

30

【0219】

X M E S の発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅 (c o a m p l i f i c a t i o n) 及び標準曲線から得た結果の補間もある (例えば、M e l b y , P . C . ら (1 9 9 3) J . I m m u n o l . M e t h o d s , 1 5 9 : 2 3 5 - 2 4 4 ; D u p l a a , C . ら (1 9 9 3) A n a l . B i o c h e m . 2 1 2 : 2 2 9 - 2 3 6 を参照) 。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色応答によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

40

【0220】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌク

50

レオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおける標的として用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多形性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

10

【0221】

別の実施例では、X M E S に特異的な抗体、X M E S またはその断片をマイクロアレイ上で要素として用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬剤-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定することが可能である。

【0222】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Sei l l i a m e r らの米国特許第 5, 8 4 0, 4 8 4 号 " C o m p a r a t i v e G e n e T r a n s c r i p t A n a l y s i s " を参照。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロファイルを提供し得る。

20

【0223】

転写イメージは、組織、株化細胞、生検またはその生物学的サンプルから単離した転写物を用いて生成し得る。転写イメージは従って、組織または生検サンプルの場合には i n v i v o、または株化細胞の場合には i n v i t r o での遺伝子発現を反映する。

30

【0224】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、i n v i t r o モデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを暗示する、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性サインと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (N u w a y s i r , E . F . ら (1 9 9 9) M o l . C a r c i n o g . 2 4 : 1 5 3 - 1 5 9、S t e i n e r , S . a n d N . L . A n d e r s o n (2 0 0 0) T o x i c o l . L e t t . 1 1 2 - 1 1 3 : 4 6 7 - 4 7 1、該文献は特に引用することを以って本明細書の一部となす)。試験化合物が、既知の毒性を有する化合物のサインと同一のサインを有する場合には、毒性特性を共有している可能性がある。フィンガープリントまたはシグネチャは、多数の遺伝子及び遺伝子ファミリーからの発現情報を含んでいる場合には、最も有用且つ正確である。理想的には、発現のゲノム全域にわたる測定が最高品質のシグネチャを提供する。自己の発現が任意の試験された化合物により変化しない遺伝子が同様に重要であっても、このような遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを規準化する。規準化手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素への遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの阻止に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない (例えば 2 0 0 0 年 2 月 2 9 日に N a t i o n a l I n s t i t u t e o f E n v i r o n m e n t a l H e a l t h S

40

50

ciencesより発行されたPress Release 00-02を参照されたい。これについては<http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>で入手可能である)。従って、中毒学的スクリーニングの際に毒性シグネチャを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0225】

或る実施例では、核酸を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理した生物学的サンプル中で発現した核酸は、本発明のポリヌクレオチドに特異的な1つ若しくは複数のプローブでハイブリダイズし、それによって本発明のポリヌクレオチドに対応する転写レベルを定量し得る。処理した生物学的サンプル中の転写レベルを、非処理生物学的サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

10

【0226】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関連する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更に分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。従って細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により分離が達成される(前出のSteiner及びAnderson)。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの物質を用いてゲルで染色することにより、分散した、独特な位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または非処理のいずれかの生物学的サンプルから得られるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

20

30

【0227】

タンパク質の(proteomic)プロフィールは、XMESに特異的な抗体を用いてXMES発現レベルを定量することによっても作成し得る。或る実施例では、マイクロアレイ上でエレメントとして抗体を用い、マイクロアレイをサンプルに曝して各アレイ要素へのタンパク質結合レベルを検出することによりタンパク質発現レベルを定量する(Lueking, A.ら.(1999) Anal. Biochem. 270:103-111, Mendozze, L.G.ら.(1999) Biotechniques 27:778-788)。検出は当分野で既知の様々な方法で行うことができ、例えば、チオールまたはアミノ反応性蛍光化合物を用いてサンプル中のタンパク質を反応させ、各アレイのエレメントにおける蛍光結合の量を検出し得る。

40

【0228】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので(Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがタンパク質のプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用た

50

り得る。更に、体液中での転写の分析はmRNA急速な分解により困難であるので、タンパク質のプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【0229】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。処理された生物学的サンプル中で発現したタンパク質は、各タンパク質の量を定量し得るように分離する。各タンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中の対応するタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。個々のタンパク質は、個々のタンパク質のアミノ酸残基をシーケンシングし、これら部分配列を本発明のポリペプチドと比較することにより同定する。

10

【0230】

別の実施例では、タンパク質を含有する生物学的サンプルを試験化合物で処理することにより試験化合物の毒性を算定する。生物学的サンプルから得たタンパク質は、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いてインキュベートする。抗体により認識されたタンパク質の量を定量する。処理された生物学的サンプル中のタンパク質の量を、非処理生物学的サンプル中のタンパク質の量と比較する。両サンプルのタンパク質量の差は、処理サンプル中の試験化合物に対する毒性反応を示す。

【0231】

マイクロアレイは、本技術分野でよく知られている方法を用いて調製し、使用し、そして分析する(Brennan, T. M. ら(1995)の米国特許第5,474,796号、Schena, M. ら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler らの(1995) PCT出願第WO95/251116号、Shalon, D. らの(1995) PCT出願第WO95/35505号、Heller, R. A. ら(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M. J. らの(1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, 編集。(1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特に引用することを以って本明細書の一部となす。

20

30

【0232】

本発明の別の実施例では、天然のゲノム配列をマッピングする際に有効なハイブリダイゼーションプローブを産出するため、XMESをコードする核酸配列を用いることが可能である。コード配列または非コード配列のいずれかを用いることができ、或る例では、コード配列全体で非コード配列が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC)、細菌P1産物、或いは単一染色体cDNAライブラリに対してマッピングされる(Harrington, J. J. ら(1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C. M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B. J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限酵素断片長多型(RFLP)と関連させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。(Lander, E. S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

40

【0233】

蛍光原位ハイブリッド形成法(FISH)は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る(前出のHeinz-Ulrich, ら(1995) in Meyers, 96

50

5 - 968 ページ、等を参照) 遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいは Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的染色体地図上の X M E S をコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性或いは特定の疾患に対する素因は、その疾患に関係する DNA の領域を画定するのに役立つものであり、従って更に位置クローニングする試みとなり得る。

【0234】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなどの別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値がある。疾患または症候群に關与する遺伝子が、血管拡張性失調症の 11q22 - 23 領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる (Gatti, R. A. ら (1988) Nature 336: 577 - 580 等を参照) 転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

10

【0235】

本発明の別の実施例では、種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、X M E S、X M E S の触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになる。X M E S とテストされる薬剤との結合複合の形成は計測できる。

20

【0236】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる (Geysen, らの (1984) PCT 出願番号 WO 84 / 03564 等を参照) この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基質上で合成する。試験用化合物は、X M E S 或いはその断片と反応させ、洗浄する。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合した X M E S を検出する。精製した X M E S はまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

30

【0237】

別の実施例では、競合薬スクリーニングアッセイを用いることができる。このアッセイでは、X M E S を結合することができる中和抗体が、X M E S を結合するための試験化合物と特異的に競合する。この方法では、抗体が、1 個若しくは数個の抗原決定因子を X M E S と共有するペプチドの存在を検出する。

【0238】

別の実施例では、新規技術が現在知られているヌクレオチド配列の特性 (限定するものではないがトリプレット遺伝暗号及び特異的塩基対の相互作用等を含む) に依存するのであれば、依然として発展すべきいかなる分子生物学技術においても、X M E S をコードするヌクレオチド配列を用いることができる。

40

【0239】

更に詳細説明をしなくとも、当業者であれば以上の説明を以って本発明を最大限に利用できるであろう。従って、これ以下に記載する実施例は単なる例示目的にすぎず、いかようにも本発明を限定するものではない。

【0240】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第 60 / 210, 233 号、同第 60 / 213, 465 号、および同第 60 / 249, 019 号に

50

言及することをもって本明細書の一部とする。

【0241】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

Incyte cDNAは、LIFESEQ GOLDデータベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)に記載されたcDNAライブラリに由来するものであり、表4の列5に列記した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるTRIZOL(Life Technologies)等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムにおいて遠心分離するかクロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

10

【0242】

RNAの純度を高めるため、RNAのフェノールによる抽出及び沈殿を必要な回数繰り返した。場合によっては、DNアーゼでRNAを処理した。殆どのライブラリでは、オリゴd(T)連結常磁性粒子(Promega)、OLIGOTEXラテックス粒子(QIAGEN, Valencia CA)またはOLIGOTEX mRNA精製キット(QIAGEN)を用いて、ポリ(A+) RNAを単離した。別法では、別のRNA単離キット、例えばPOLY(A)PURE mRNA精製キット(Ambion, Austin TX)を用いて組織溶解物からRNAを直接単離した。

20

【0243】

場合によってはStratagene社へのRNA提供を行い、対応するcDNAライブラリをStratagene社が作製することもあった。そうでない場合は、本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法を用いて、UNIZAPベクターシステム(Stratagene)またはSUPERSCRIPTプラスミドシステム(Life Technologies)を用いてcDNAを合成し、cDNAライブラリを作製した。(前出のAusubel, 1997, unit 5.1-6.6等を参照。)逆転写は、オリゴd(T)またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素でcDNAを消化した。殆どのライブラリに対して、cDNAのサイズ(300~1000bp)選択は、SEPHACRYL S1000、SEPHAROSE CL2BまたはSEPHAROSE CL4Bカラムクロマトグラフィー(Amersham Pharmacia Biotech)、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖cDNAに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素でcDNAを消化した。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、pSPORT1プラスミド(Life Technologies)、PCDNA2.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)あるいはpINCY(Incyte Genomics, Palo Alto CA)またはその誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BlueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含む大腸菌細胞に形質転換した。

30

40

【0244】

2. cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム(Stratagene)を用いた*in vivo*切除によって、或いは細胞溶解によって、プラスミドを宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、AGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL

50

8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミド精製キットの中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥せずに、4 で保管した。

【0245】

別法では、ハイスループットフォーマットにおいて直接結合PCR法を用いて宿主細胞溶解物からプラスミドDNAを増幅した(Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probe, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナー(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

10

【0246】

3. シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー(Applied Biosystems)またはPTC-200 サーマルサイクラー(MJ Research)をHYDRAマイクロディスペンサー(Robbins Scientific)またはMICROLAB 2200(Hamilton)液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit(Applied Biosystems)に与えられた試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム(Molecular Dynamics)か、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム(Applied Biosystems)か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法(前出のAusubel, 1997, unit 7.7に概説)を用いて決定した。cDNA配列の幾つかを選択して、実施例8に記載した方法で配列を伸長させた。

20

30

【0247】

Incyte cDNAに由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ(A)配列の除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。IncyteのcDNA配列、またはその翻訳を公共のデータベース(例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM)及びPFAM等隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対して問い合わせた(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。Eddy, S.R. (1996) Cuff. Opin. Struct. Biol. 6:361-365等を参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築した。或いは、GenBank cDNA、GenBank EST、ステッチされた配列、ストレッチされた配列またはGenscan予測コード配列(実施例4及び5を参照)を用いてIncyte cDNAの集団を完全長まで伸長させた。Phred、Phrap及びConsedに基づくプログラムを用いて構築し、GenMark、BLAST及びFASTA

40

50

に基づくプログラムを用いてcDNAの集団をオープンリーディングフレームに対してスクリーニングした。対応する完全長ポリペプチド配列を誘導するべく完全長ポリヌクレオチド配列を翻訳した。或いは、本発明のポリペプチドは完全長翻訳ポリペプチドの任意のメチオニン残基で開始し得る。引き続き、GenBankタンパク質データベース(genpept)、SwissProt、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM及びPrositate等のデータベース、PFAM等の隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア(日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA)及びLASERGENEソフトウェア(DNA STAR)を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列と配列の一致率も計算するMEGALIGNマルチシーケンスアラインメントプログラム(DNA STAR)に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって特定されるデフォルトパラメータを用いて生成する。

10

【0248】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログラム及びアルゴリズムの概略と、適用可能な説明、引用文献、閾値パラメータを表7に示す。用いたツール、プログラム及びアルゴリズムを表7の列1に、それらの簡単な説明を列2に示す。列3は好適な引用文献であり、全ての文献はそっくりそのまま引用を以って本明細書の一部となす。適用可能な場合には、列4は2つの配列が一致する強さを評価するために用いたスコア、確率値その他のパラメータを示す(スコアが高ければ高いほど、また確率値が低ければ低いほど2配列間の相同性が高くなる)。

20

【0249】

完全長ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の組み立て及び分析に用いる上記のプログラムは、SEQ ID NO: 10 - 18のポリヌクレオチド配列断片の同定にも利用できる。ハイブリダイゼーション及び増幅技術に有用である約20~約4000ヌクレオチドの断片を表4の列4に示した。

【0250】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の細胞外メッセンジャーは、公共のゲノム配列データベース(例えば、gbpriやgbhtg)においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである(Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94及びBurge, C.及びS. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8:346-354参照)。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列が細胞外メッセンジャーをコードするかを決定するために、コードされたポリペプチドをPFAMモデルにおいて細胞外メッセンジャーについて問合せで分析した。潜在的な細胞外メッセンジャーが、細胞外メッセンジャーとしてアノテーションが付けられたインサイトcDNA配列に対する相同性を基に同定された。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgbpri及びgbhtgと比較した。必要であれば、genpeptからヒットしたトップのBLASTと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌク

30

40

50

レオチド配列は、実施例 3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA 配列及び/または公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

【0251】

5 ゲノム配列データのcDNA配列データへのアセンブリ ステッチ配列 (Stitched Sequence)

部分cDNA配列は、実施例 4に記載のGenscan遺伝子同定プログラムにより予測されたエキソンを用いて伸長させた。実施例 3に記載されたように構築された部分cDNAは、ゲノムDNAにマッピングし、関連するcDNA及び1つ若しくは複数のゲノム配列から予測されたGenscanエキソンを含むクラスタに分解した。cDNA及びゲノム情報を統合するべくグラフ理論及び動的プログラミングに基づくアルゴリズムを用いて各クラスタを分析し、引き続いて確認、編集または伸長して完全長配列を産出するような潜在的スプライス変異体を生成した。間隔全体の長さがクラスタ中の2以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、1つのcDNA及び2つのゲノム配列に間隔が存在する場合、3つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をcDNA配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。1種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖 (cDNA - cDNA または ゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) に優先した。結果として得られるステッチ配列は、BLAST分析により公共データベース genpept 及び gbpr1 に翻訳されて比較された。Genscanにより予測された不正確なエキソンは、genpept からヒットしたトップのBLASTと比較することにより修正した。必要な場合には、追加cDNA配列を用いるかゲノムDNAの検査により配列を更に伸長させた。

【0252】

6 ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分DNA配列は、BLAST分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。先ず、BLASTプログラムを用いて、GenBankの霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例 3に記載されたようにアセンブルされた部分cDNAを問い合わせた。次に、最も近いGenBankタンパク質相同体をBLAST分析によりIncyte cDNA配列または実施例 4に記載のGenscanエキソン予測配列のいずれかと比較した。結果として得られる高スコアリングセグメント対 (HSP) を用いてキメラタンパク質を産出し、翻訳した配列をGenBankタンパク質相同体上にマッピングした。元のGenBankタンパク質相同体に関連して、キメラタンパク質内で挿入または削除が起こり得る。GenBankタンパク質相同体、キメラタンパク質またはその両方をプローブとして用い、公共のヒトゲノムデータベースから相同ゲノム配列を検索した。このようにして、部分的なDNA配列を相同ゲノム配列の付加によりストレッチすなわち伸長した。結果として得られるストレッチ配列を検査し、完全遺伝子を含んでいるか否かを決定した。

【0253】

6 XMESをコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO: 10 - 18を構築するために用いた配列を、BLAST及びSmith-Watermanアルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQデータベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO: 10 - 18と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrapなどの構築アルゴリズムを使用して、連続的配列及び重複した配列のクラスターに構築した (表7)。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて

、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

【0254】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のpアームの末端に関連して測定する。(センチモルガン(cM)は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1cMは、ヒト中のDNAの1メガベース(Mb)にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。)cM距離は、配列が各クラスタ内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなGene 10
nethonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。NCBI「GeneMap 99」(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>)などの公衆が入手可能なヒト遺伝子マップおよびその他の情報源を用いて、上記した区間が既に同定されている疾患遺伝子マップ内若しくは近傍に位置するかを決定できる。

【0255】

このようにして、SEQ ID NO: 16は190.80から197.60センチモルガン内で染色体2にマップされた。

【0256】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

ノーザン分析は、転写された遺伝情報の存在を検出するために用いられる実験技術であり 20
、標識されたヌクレオチド配列の、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜へのハイブリダイゼーションに関与している。(前出のSambrook, 7章、同Ausubel, (1995) 4章及び16章等を参照。)

BLASTに適用する類似のコンピュータ技術を用いて、GenBankやLifeSeq (Incyte Genomics)等のcDNAデータベースにおいて同一または関連分子を検索する。ノーザン分析は、多数の膜系ハイブリダイゼーションよりも断然速い。更に、特定の同一を厳密な或いは相同的なものとして分類するか否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

(BLASTスコア \times 配列一致率)

$5 \times \{ \text{長さ(配列1)}, \text{長さ(配列2)} \}$ の最小値1), length(Seq. 2)) } 30

積スコアは、2つの配列間の類似度及び配列が一致する長さの両方を考慮している。積スコアは、0~100の規準化された値であり、次のようにして求める。BLASTスコアにヌクレオチドの配列一致率を乗じ、その積を2つの配列の短い方の長さの5倍で除する。高スコアリングセグメント対(HSP)に一致する各塩基に+5のスコアを割り当て、各不適性塩基対に-4を割り当てることにより、BLASTスコアを計算する。2つの配列は、2以上のHSPを共有し得る(ギャップにより離隔され得る)。2以上のHSPがある場合には、最高BLASTスコアの塩基対を用いて積スコアを計算する。積スコアは、断片的重畳とBLASTアラインメントの質とのバランスを表す。例えば積スコア10 40
0は、比較した2つの配列の短い方の長さ全体にわたって100%一致する場合のみ得られる。積スコア70は、一端が100%一致し、70%重畳しているか、他端が88%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。積スコア50は、一端が100%一致し、50%重畳しているか、他端が79%一致し、100%重畳しているかのいずれかの場合に得られる。

【0257】

或いは、XMESをコードするポリヌクレオチド配列を、ポリヌクレオチド配列が派生した組織源に関連して分析した。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列(実施例3を参照)と少なくとも一部は重畳するようにアセンブルされる。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系 50

、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肺、筋骨格系、神経系、脾臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの1つの生物/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/病状カテゴリー即ち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、鬱血、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。演算結果の割合は、X M E S をコードする c D N A の組織特異発現または疾患特異発現を反映する。c D N A 配列及び c D N A ライブラリ/組織情報については、L I F E S E Q G O L D データベース (I n c y t e G e n o m i c s , P a l o A l t o C A) で見られる。

10

【0258】

8 ポリヌクレオチドをコードする X M E S の伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、O L I G O 4 . 0 6 ソフトウェア (N a t i o n a l B i o s c i e n c e s) 或いは別の適切なプログラムを用いて、c D N A から設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの区間は全て回避した。

20

【0259】

配列を伸長するために、選択されたヒト c D N A ライブラリを用いた。2段階以上の伸長が必要または望ましい場合には、付加的プライマー或いはプライマーのネストセットを設計した。

【0260】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用した P C R 法によって得られた。P C R は、P T C - 2 0 0 サーマルサイクラー (M J R e s e a r c h , I n c .) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液は、鋳型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と β -メルカプトエタノールを含むバッファー、Taq DNAポリメラーゼ (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) 、E L O N G A S E 酵素 (L i f e T e c h n o l o g i e s) 、P f u D N A ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を含む。プライマーの組、P C I A と P C I B に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1 94 で3分間、ステップ2 94 で15秒、ステップ3 60 で1分間、ステップ4 68 で2分間、ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す、ステップ6 68 で5分間、ステップ7 4 で保管。別法では、プライマーの組、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ1 94 で3分間、ステップ2 94 で15秒、ステップ3 57 で1分間、ステップ4 68 で2分間、ステップ5 ステップ2、3、及び4を20回繰り返す、ステップ6 68 で5分間、ステップ7 4 で保管。

30

40

【0261】

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 μ lの希釈していないPCR産物に溶解した100 μ lのP I C O G R E E N 定量試薬 (0 . 2 5 (v / v) P I C O G R E E N ; M o l e c u l a r P r o b e s , E u g e n e O R) を不透明な蛍光光度計プレート (C o m i n g C o s t a r , A c t o n M A) の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをF l u o r o s k a n I I (L a b s y s t e m s O y , H e l s i n k i , F i n l a n d) でスキャンした。反応混合物のアリコート5~10 μ lを1%アガロースミニゲル上で電気泳動法によって解析し、どの反応が配列の伸長に成功したかを決定した。

50

【0262】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクレアーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結反応前に音波処理またはせん断した。シヨットガン・シークエンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6~0.8%) のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位の張出部 (overhang) を満たし、コンピテント大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37 で一晩培養した。

【0263】

細胞を溶解して、Taq DNAポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) 及びPfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) を用いて以下の手順でDNAをPCR増幅した。ステップ1 94 で3分間 ステップ2 94 で15秒 ステップ3 60 で1分間 ステップ4 72 で2分間 ステップ5 ステップ2、3、及び4を29回繰り返す ステップ6 72 で5分間 ステップ7 4 で保管。上記したようにPICOGREEN試薬 (Molecular Probes) でDNAを定量化した。DNAの回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは20%ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シークエンシングプライマー、及びDYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) またはABI PRISM BIGDYE ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット (Applied Biosystems) を用いてシークエンシングした。

【0264】

同様に、上記手順を用いて完全長ヌクレオチド配列を検証し、或いはそのような伸長のために設計されたオリゴヌクレオチド及び適切なゲノムライブラリを用いて5'調節配列を得る。

【0265】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用
SEQ NO ID: 10-18 から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、cDNA、ゲノムDNAまたはmRNAをスクリーニングする。約20塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドを、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Bioscience) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、50 pmolの各オリゴマーと、250 µCiの[⁻³²P] アデノシン三リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech)) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) とを組み合わせて用いることにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて実質的に精製する。Ase I、Bgl II、EcoRI、Pst I、Xba IまたはPvu II (DuPont NEN) のいずれか1つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノムDNAの典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分10⁷ カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0266】

各消化物から得たDNAは、0.7%アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytr 50

an Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH)に移す。ハイブリダイゼーションは、40 で16時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば0.1xクエン酸ナトリウム食塩水及び0.5%ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

【0267】

10 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの連鎖または合成は、フォトリソグラフィ、圧電印刷（インクジェット印刷、前出のBaldeschweiler等を参照）、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものを用いて達成することが可能である。上記各技術において基質は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである（Schena（1999）前出）。推奨する基質には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基質の表面にエレメントを配置及び結合させてもよい。通常のアレイは、手作業で、または利用可能な方法や機械を用いて作製でき、任意の適正数のエレメントを有し得る（Schena, M. ら（1995）Science 270:467-470、Shalton, D. ら（1996）Genome Res. 6:639-645、Marshall, A. 及びJ. Hodgson（1998）Nat. Biotechnol. 16:27-31.を参照）。

【0268】

完全長cDNA、発現遺伝子配列断片（EST）、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントを構成し得る。ハイブリダイゼーションに好適な断片またはオリゴマーを、レーザGENEソフトウェア（DNASTAR）等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに接合される。ハイブリダイゼーション後、生物学的サンプルからハイブリダイズされていないヌクレオチドを除去し、蛍光スキャナを用いて各アレイエレメントにおいてハイブリダイゼーションを検出する。或いは、レーザ脱着及び質量スペクトロメトリを用いてもハイブリダイゼーションを検出し得る。マイクロアレイ上のエレメントにハイブリダイズする各ポリヌクレオチドの相補性の度合及び相対存在度は、算定し得る。一実施例におけるマイクロアレイの調整及び使用について、以下に詳述する。

【0269】

組織または細胞サンプルの準備

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ（dT）セルロース法を用いてポリ（A）⁺ RNAを精製する。各ポリ（A）⁺ RNAサンプルを、MLV逆転写酵素、0.05 pg/μlのオリゴ（dT）プライマー（21mer）、1x第一鎖合成バッファー、0.03 unit/μlのRNAアーゼ阻害因子、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μMのdCTP-Cy3（BDS）またはdCTP-Cy5（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット（Incyte）を用いて、200 ngのポリ（A）⁺ RNAを含む25 ml容量で行う。特異的対照ポリ（A）⁺ RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから*in vitro*転写により合成する。37 で2時間インキュベートした後、各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム（CLONTECH Laboratories, Inc.（CLONTECH）, Palo

Alto CA) を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルは、1 ml のグリコーゲン (1 mg/ml) を用いて析出させたエタノール、60 ml の酢酸ナトリウム及び 300 ml の 100% エタノールである。サンプルは次に、Speed VAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) を用いて乾燥して仕上げ、14 µl 5×SSC/0.2% SDS 中で再懸濁する。

【0270】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを生成する。各アレイエレメントは、クローン化 cDNA インサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。PCR 増幅は、cDNA インサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30 サイクルの PCR で 1~2 ng の初期量から 5 µg より大きい最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて精製される。

10

【0271】

精製したアレイエレメントは、ポリマーコートされたスライドガラス上に固定する。顕微鏡スライドガラス (Corning) は、処理中及び処理後に大量の蒸留水洗液を用いて 0.1% の SDS 及びアセトン中で超音波により洗浄する。スライドガラスは、4% フッ化水素酸 (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA) 中でエッチングし、蒸留水中で広範囲にわたって洗浄し、95% エタノール中で 0.05% アミノプロピルシラン (Sigma) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、110 °C の天火で硬化させる。

20

【0272】

米国特許第 5,807,522 号で説明されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度が 100 ng/µl のアレイエレメント DNA 1 µl を高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント (open capillary printing element) に充填する。装置はここで、スライド毎に約 5 nl のアレイエレメントサンプルを加える。

30

【0273】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV 架橋剤 (Stratagene) を用いて UV 架橋する。マイクロアレイは、室温において 0.2% SDS で 1 度洗浄し、蒸留水で 3 度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) 中の 0.2% カゼイン中において 60 °C で 30 分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように 0.2% SDS 及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

【0274】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、5×SSC、0.2% SDS ハイブリダイゼーション緩衝液に Cy3 及び Cy5 標識した cDNA 合成産物を各 0.2 µg 含む 9 µl のサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合体は、65 °C まで 5 分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して 1.8 cm² のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きいキャピティを有する防水チェンバーに移行させる。チェンバーのコーナーに 140 µl の 5×SSC を加えることにより、チェンバー内部を湿度 100% に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 °C で約 6.5 時間インキュベートする。アレイは、第 1 洗浄緩衝液中 (1×SSC, 0.1% SDS) において 45 °C で 10 分間洗浄し、第 2 洗浄緩衝液中 (0.1×SSC) において 45 °C で 10 分間各々 3 度洗浄して乾燥させる。

40

【0275】

検出

50

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy3の励起のためには488nm、Cy5の励起のためには632nmでスペクトル線を生成し得るInnova 70混合ガス10Wレーザ(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20×顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザ光を集中させる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御X-Yステージに置き、対物レンズを通過してラスタスキャンする。本実施例で用いた1.8cm×1.8cmのアレイは、20μmの解像度でスキャンした。

【0276】

2つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光色素を連続的に励起する。放射された光は、2つの蛍光色素に応じて波長に基づき2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に分割される。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、シグナルをフィルタリングする。用いる蛍光色素の最大発光は、Cy3では565nm、Cy5では650nmである。装置は両方の蛍光色素からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルターを用いて各アレイを通常2度スキャンし、蛍光色素1つにつき1度スキャンする。

10

【0277】

スキャンの感度は通常、既知濃度のサンプル混合体に添加されるcDNA対照種により生成されるシグナル強度を用いて校正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度をハイブリダイジング種の重量比1:100,000に相関させる。異なる源(例えば試験及び対照細胞を表す)からの2つのサンプルを、各々異なる蛍光色素で標識し、他と異なって発現した遺伝子を同定するために単一のアレイにハイブリダイズする場合には、2つの蛍光色素を有する校正cDNAの標識サンプルにより校正し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加える。

20

【0278】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログ-デジタル(AID)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲へのリニア20色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なる蛍光色素を同時に励起及び測定する場合には、各蛍光色素の発光スペクトルを用いて、データは先ず蛍光色素と蛍光色素の間の光学磁気プリンティング(発光スペクトルの重畳に起因する)に集められる。

30

【0279】

グリッドは蛍光シグナルイメージ上に重ねられ、それによって各スポットからのシグナルはグリッドの各エレメントに集められる。各エレメント内の蛍光シグナルは統合され、シグナルの平均強度に応じた数値が得られる。シグナル分析に用いるソフトウェアは、GEMTOOLS遺伝子発現分析プログラム(Incyte)である。

40

【0280】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

XMESをコードする配列或いはその任意の一部に対して相補的配列は、天然のXMESの発現を検出し、低下させ、または阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)とXMESをコードする配列とを用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な5'配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、XMESをコードする転写物にリボソ

50

ームが結合しないように相補的オリゴヌクレオチドをデザインする。

【0281】

1.2 X M E S の発現

X M E S の発現及び精製は、細菌またはウイルスをベースにした発現系を用いて行うことができる。細菌で X M E S を発現するために、抗生物質耐性及び c D N A の転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターに c D N A をサブクローニングする。このようなプロモーターには、l a c オペレーター調節エレメントに関連する T 5 または T 7 バクテリオファージプロモーター及び t r p - l a c (t a c) ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、B L 2 1 (D E 3) 等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル - D チオガラクトピラノシド (I P T G) で誘導されると X M E S を発現する。真核細胞での X M E S の発現は、一般にバキュロウイルスとして知られている A u t o g r a p h i c a c a l i f o r n i c a 核多角体病ウイルス (A c M N P V) を昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に感染させて行う。バキュロウイルスの可欠ポリヘドリン遺伝子を、相対的組換え、或いは転移プラスミドの仲介に關与する細菌仲介遺伝子転移のどちらかによって、X M E S をコードする c D N A と置換する。ウイルスの感染力は維持され、強いポリヘドリンプロモーターによって高いレベルの c D N A の転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合は S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a (S f 9) 昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる。(Engelhard, E. K. ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 3224 - 3227, Sandig, V. ら (1996) Hum. Gene Ther. 7 : 1937 - 1945. 等を参照)。

【0282】

殆どの発現系では、融合タンパク質として X M E S を合成するのに例えばグルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) またはペプチドエピトープ標識、例えば F L A G や 6 - H i s を用いる。これらを用いることにより、未精製細胞溶解物から組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製を迅速に 1 ステップで行うことができる。G S T は日本住血吸虫からの 26 k D a の酵素であり、タンパク質の活性及び抗原性を維持した状態で、固定化グルタチオン上で融合タンパク質の精製を可能とする (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) 。精製後、G S T の部分を特定の開発部位において X M E S からタンパク質的に切断することが可能である。F L A G は 8 アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗 F L A G 抗体 (E a s t m a n K o d a k) を用いて免疫親和性精製を可能にする。6 ヒスチジン残基が連続して伸長した 6 - H i s は、金属キレート樹脂 (Q I A G E N) 上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出の A u s u b e l (1995) 10 章、16 章に記載されている。これらの方法で精製した X M E S を直接用いて以下の 実施例 16、及び 17 のアッセイを行うことができる。

【0283】

1.3 機能的アッセイ

X M E S 機能は、哺乳動物細胞培養系において生理学的に高められたレベルでの X M E S をコードする配列の発現によって評価する。c D N A を、c D N A を高いレベルで発現する強いプロモーターを含む哺乳動物発現ベクターにサブクローニングする。選り抜きのベクターには、p C M V S P O R T (L i f e T e c h n o l o g i e s) 及び p C R 3 . 1 (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d C A) が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リポソーム製剤或いは電気穿孔法を用いて、5 ~ 10 μ g の組換えベクターをヒト細胞株、例えば内皮由来または造血由来の細胞株に一時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む 1 ~ 2 μ g のプラスミドを同時に形質移入する。標識タンパク質の発現により、形質移入細胞と非形質移入細胞を区別する手段が与えられる。また、標識タンパク質の発現によって、c D N A の組換え

ベクターからの発現を正確に予想できる。標識タンパク質は、例えば緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、CD64またはCD64-GFP融合タンパク質から選択できる。自動化された、レーザー光学に基づく技術であるフローサイトメトリー (FCM) を用いて、GFPまたはCD64-GFPを発現する形質移入された細胞を同定し、その細胞のアポトーシス状態や他の細胞特性を評価する。FCMは、細胞死に先行するか或いは同時に発生する現象を診断する蛍光分子の取込を検出して計量する。このような現象として挙げられるのは、プロピジウムヨウ化物によるDNA染色によって計測される核DNA内容物の変化、前方光散乱と90°側面光散乱によって測定される細胞のサイズと重量の変化、プロモデオキシウリジンの取込量の低下によって計測されるDNA合成の下方調節、特異抗体との反応性によって計測される細胞表面及び細胞内におけるタンパク質の発現の変化、及び蛍光複合アネキシンVタンパク質の細胞表面への結合によって計測される原形質膜組成の変化とがある。フローサイトメトリー法については、Ormerod, M. G. (1994) Flow Cytometry Oxford, New York, NY. に記述がある。

10

20

30

40

50

【0284】

遺伝子発現におけるXMESの影響は、XMESをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのいずれかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG (IgG) の保存領域と結合する。形質転換細胞と非形質転換細胞は、ヒトIgGまたはCD64に対する抗体 (DYNAL, Lake Success, NY) で覆われた磁気ビーズを用いて有効に分離することができる。mRNAは、本技術分野で公知の方法で細胞から精製することができる。XMESその他の目的の遺伝子をコードするmRNAの発現は、ノーザン分析或いはマイクロアレイ技術で分析することができる。

【0285】

1.4 XMESに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE; Harrington, M. G. (1990) Methods Enzymol. 182: 488-495等を参照) または他の精製技術を用いて実質上精製されたXMESを用いて、標準プロトコルでウサギを免疫化して抗体を産出する。

【0286】

或いは、レーザGENEソフトウェア (DNASTAR) を用いてXMESアミノ酸配列を解析し、免疫抗原性の高い領域を決定する。そして対応するオリゴペプチドを合成し、このオリゴペプチドを用いて当業者によく知られている方法で抗体を生成する。適切なエピトープ、例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域にあるエピトープの選択については、当分野で公知である (前出のAusubel, 1995, 11章等を参照)。

【0287】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた反応によってKLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) に結合させて、免疫抗原性を高める (例えば、前出Ausubel, 1995を参照)。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及びXMES活性を検査するには、ペプチドまたはXMESを基質に結合し、1%BSAを用いてブロックし、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素で標識したヤギ抗ウサギIgGと反応させる。

【0288】

1.5 特異的抗体を用いる天然XMESの精製

天然または組換えXMESを、XMES特異抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、抗XMES抗体を活

性化クロマトグラフィー用樹脂、例えばCNBr活性化セファロース (Amersham Pharmacia Biotech) と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0289】

XMESを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、XME Sを優先的に吸着する条件下(例えば洗浄剤が存在する高イオン強度緩衝液)でカラムを洗浄する。抗体とXME Sの結合を破壊する条件(例えばpH 2~3の緩衝液、或いは尿素またはチオシアン酸塩イオン等の高濃度のカオトロップ剤)でカラムを溶出させ、XME Sを回収する。

【0290】

1.6 XME Sと相互作用する分子の同定

XME Sまたは生物学的に活性であるXME S断片を、¹²⁵Iボルトンハンター試薬で標識する。(例えば、Bolton A. E. 及びW. M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529-539を参照)。マルチウェルプレートの穴の中に予め配列しておいた候補分子を、標識したXME Sと共にインキュベートして洗浄し、標識したXME S複合体を有する全ての穴をアッセイする。様々なXME S濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したXME Sの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0291】

或いは、XME Sと相互作用する分子は、Fields, S. 及びO. Song (1989) Nature 340:245-246 に記載されているような酵母2ハイブリッドシステムを用いて分析するか、またはMATCHMAKERシステム(Clontech)等の2ハイブリッドシステムに基づく市販のキットを用いて分析する。

【0292】

XME Sはまた、ハイスループットな方法で酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCALLINGプロセス(CuraGen Corp., New Haven CT)に用いて、遺伝子の2大ライブラリにコードされる遺伝子間の全ての相互作用を決定することができる(Nandabalan, K. ら (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0293】

1.7 XME S活性の実証

XME S-1活性のアッセイは、肝細胞成長因子(HGF)活性剤の抑制活性を測定する。このアッセイでは、HGF活性剤(450 ng/ml)が0.05%のCHAPSを含有するPBSで様々な濃度の精製されたXME S-1と混合される。また酵素抑制剤複合体を形成するために37℃で30分間インキュベートする。混合液中の残りのHGF-変換活性は同量の一本鎖HGF(sc-HGF)(0.05% CHAPS含有PBS 1.5 µg/ml)と硫酸デキストラン(100 mg/ml, MWCO=500,000, Sigma)を加えて測定した。続いて更に2時間インキュベートした後に、還元したゲル状態でSDS-PAGEにより分析した。ゲルはクーマシーブルーで染色し、sc-HGFの量とヘテロ二量体は染色したバンドをスキャンすることにより測定した。XME S-1のHGF活性に対する抑制活性は、HGF全体を形成する残りの一本鎖の比率を計算することにより見積もられる(Shimomura, T. ら (1997) J. Biol. Chem. 272:6370-6376)。

【0294】

XME S活性の為のアッセイは、スィスマウスの3T3細胞における新規に開始されたDNA合成として細胞増殖を測定する。当分野で公知の方法を用いて、XME Sをコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを静止状態の3T3培養細胞に加える。一過性に形質移入された細胞は次に、放射性DNA前駆分子である[³H]チミジンの存在下でインキュベートされる。適用可能な場合には、様々な量のXME Sリガンドが形質移入された細胞に加えられる。酸によって沈殿され得るDNAへの[³H]チミジンの取り込みは、適切な時間間隔で測定され、その取り込み量は新規に合成されたDNAの量に直接比例す

10

20

30

40

50

る。

【0295】

当業者は、本発明の範囲及び精神から逸脱することなく本発明の記載した方法及びシステムの種々の改変を行い得る。本発明について説明するにあたり特定の好適実施例に関連して説明を行ったが、本発明の範囲が、そのような特定の実施例に不当に制限されるべきではないことを理解されたい。実際に、分子生物学または関連分野の専門家には明らかな、本明細書に記載されている本発明の実施方法の様々な改変は、特許請求の範囲内にあるものとする。

【0296】

(表の簡単な説明)

表1は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列の命名法の概略を示す。

10

【0297】

表2は、GenBank識別番号及び本発明のポリペプチドに最も近いGenBank相同体の注釈を示す。各ポリペプチドとそのGenBank相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【0298】

表3は、予測されるモチーフ及びドメインを含む本発明のポリヌクレオチド配列の構造的特徴を、ポリペプチドの分析に用いるための方法、アルゴリズム及び検索可能なデータベースと共に示す。

20

【0299】

表4は、本発明のポリヌクレオチド配列を構築するために用いたcDNA及びゲノムDNA断片を、ポリヌクレオチド配列の選択した断片と共に示す。

【0300】

表5は、本発明のポリヌクレオチドの代表的なcDNAライブラリを示す。

【0301】

表6は、表5に示したcDNAライブラリの作製に用いた組織及びベクターを説明する付表である。

【0302】

表7は、本発明のポリヌクレオチドとポリペプチドの分析に用いたツール、プログラム、アルゴリズムを、適用可能な説明、引用文献及び閾値パラメータと共に示す。

30

【表1】

表1

Incyte エクトID	プロシ No:	ボバチドSEQ ID	Incyte ボバチドID	ボバチド SEQ ID NO:	Incyte ボバチドID
1657368	1	1657368CD1	1657368CD1	10	1657368CB1
4028972	2	4028972CD1	4028972CD1	11	4028972CB1
5398353	3	5398353CD1	5398353CD1	12	5398353CB1
71234118	4	71234118CD1	71234118CD1	13	71234118CB1
240168	5	240168CD1	240168CD1	14	240168CB1
7481107	6	7481107CD1	7481107CD1	15	7481107CB1
7476245	7	7476245CD1	7476245CD1	16	7476245CB1
5819744	8	5819744CD1	5819744CD1	17	5819744CB1
5378618	9	5378618CD1	5378618CD1	18	5378618CB1

10

20

30

40

表2-1

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NC:	融率スコア	GenBank 相合体
1	1657368CD1	93721617	3.30E-42	[ハツカネズミ]mac25 インスリン様成長因子結合タンパク質 Konatsu S. 5 (2000) Biochem Biophys Res Commun 267:109-117
2	4028972CD1	98217418	1.00E-169	[ヒト] bA108L7.1 (Kazai-タイプ セリンプロテアーゼ抑制因子ドメインを有する新規インスリン様成長因子結合タイプタンパク質) [ラット] ニューレキシン III-アルファ
3	5398353CD1	94514718	1.50E-22	Ushkaryov V.A.及びSudhof T.C. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 1993 90:6410-6414 FGF-19 [ヒト]
4	71234118CD1	93049445 91177164 91438954	1.00E-120 4.00E-59 3.20E-18	[ヒト] FGF-21 (Nishimura, T. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1444:148-151) [ハツカネズミ] polydem タンパク質 [ヒト] 神経性ペントキシン1(pentroxin 1)
5	240168CD1	92924601	1.10E-29	Omels, I.A. 5 (1996) Genomics 36:543-545 [ヒト] 肝細胞成長因子活性抑制剤 Shimomura, T. 5. (1997) J. Biol. Chem. 272:6370-6376

10

20

30

40

表2-2

ポリペプチドSBQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	確率スコア	GenBank 相同体
6	7481107CD1	9632490	7.50E-185	[ウシ]軟骨由来の形態形成タンパク質 Chang, S.C. 他.(1994) J. Biol. Chem. 269:28227-28234
7	7476245CD1	9183228	2.70E-54	[ヒト]ニューログリンB Krane, I.M. 他.(1988) J. Biol. Chem. 263:13317-13323
9	5378618CD1	94593406	2.90E-19	[ショウジョウバエ]スリットタンパク質 Kidd, T. 他.(1999) Cell 96:785-794
		99309467	0	[ハツカネズミ]ロイシノグリン神経膠腫不活性化1タンパク質前駆体

10

20

30

40

表 3-1

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残 基	潜在のリン酸化部位	潜在のグリコシル化 部位	シグネチャ配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデー タベース
1	1657368CD1	304	T250 Y251 T112 S117 T185	N159 N183 N277	M1-A30 シグナルペプチド、 Signal_cleavage::M1-A30 C53-C90 インスリン様成長因子結合タンパク 質 V121-G168 Kazal-タイプセリンプロテアーゼ抑制因子 ドメイン G186-G285 免疫グロブリン ドメイン G50-D115 インスリン様成長因子結合タンパク質シグ ネチャ L85-G171 Kazal セリンプロテアーゼ抑制因子ファミリ ーシグネチャ V184-L271 MAC25 フォリヌチン様プロスタシク リン刺激因子	HMMER SPSCAN HMMER_PFAM HMMER_PFAM HMMER_PFAM PROFILESCAN PROFILESCAN BLAST_PRODOR

10

20

30

40

【表 5】

表 6 - 2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグナチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
2	4028972CD1	1438	T11, S46, S100, T264, S290, T303, T469, S503, T531, T537, S564, S647, S714, S719, T730, T737, S762, T782, S791, T823, T878, S949, S972, T47, S79, S282, S283, T372, S392, T507, T708, T730, T795, T810, T906, Y273, Y547, Y770, Y860	N58, N105, N761, M403, N592, N776, N940, N943	C662-C673 Asx_Hydroxyl S20-M31 Gataase_Type_I Signal_cleavage:M1-G27 F10-G27, M1365-A1383 膜貫通ドメイン F55-G174, F291-R420, F479-N626, L740-I850, P903-D1034, F1126-W1201 ラミニンG ドメイン C202-C234, C651-C683, C1057-C1089 EGF様ドメイン S647-N658 Type II EG様シグナチャ E204-C224 相補体CSシグナチャ F1098-Y1437 II-βニューレキシン F717-E802, G803-Q902, G1210-T1338, T1338-V1438 代替ニューレキシン前駆体	MOTIFS MOTIFS SPSCAN HMMER HMMER_PFAM HMMER_PFAM BLUMPS_PRINTS BLUMPS_PRINTS BLAST_DOMO BLAST_PRODOM

10

20

30

40

表 3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
3	5398353CD1	208	S121 T6 T97		Signal cleavage:: MI-R27 繊維芽成長因子 FGF: H59-H139 ヘリン結合成長因子ファミリー PRO263B: L80-G94 PRO263C: F100-S112 PRO263D: P117-S136 IL1/IL6 FGF ファミリーシグネチャ PRO262A: P87-H114 PRO262B: A119-H139 HGF/FGF ファミリーシグネチャ hbgf_fgf_pgf: P87-G140 成長因子繊維芽分裂促進因子シグナルヘリン結合血管新生 PD000831: H59-H139 HGF/FGF ファミリー DM00642 P48803 47-205; S16- P165 DM00642 P48805 29-186; D32-P165 DM00642 P10767 50-207; G41-H139 DM00642 P05524 5-181; G40-P160	SPSCAN HMMER_PFAM BLIMPS_PRINTS BLIMPS_PRINTS PROFILESAN BLAST_PRODOR BLAST_DOMO
4	71234115CD1	159	S114 S2 S69 Y75 N6 N65		Signal cleavage:: MI-G35 Pentaxin ファミリー-pentaxin: S80-K141 Pentaxin ファミリー-タンパク質 BL00289C: H122-G140	SPSCAN HMMER_PFAM BLIMPS_BLOCKS

10

20

30

40

【表 7】

表3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチン配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					Pentaxin アファミリ-シグネチン pentaxin.ppf:Y100-A147 PENTAXIN シグネチン PR00895A:L36-372 PR00895C:H122-G140 前駆体シグナル PENTAXIN 糖蛋白質原形質 C-反応性カルシウム感受性 PD002153:Y48-G157 C-反応性タンパク質 DM00835 P47971 194-431:F36-I155 DM00835 P47970 187-426:I37-I155	PROFILESKAN BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM BLAST_DOMO

10

20

30

40

表 3-5

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグナルペプチド、シグナルペプチド結合反復ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
5	240168CDI	500	S11 S201 S234 S339 S34 S377 S382 S395 S422 S435 S53 T166 T197 T263 T279 T397 T487 Y431	N164 N291 N401	LDL 受容体リポタンパク質結合反復 DM00045 P98072 663-717:H314-L347 肝細胞成長因子活性化抑制剤 糖蛋白 PD120361:G84-L297, S11-P44 LDL-受容体クラス A(LDLRA) ドメインタンパク質 BL01209:C329-E341 低密度リポタンパク質 PR00261:G320-E341 シグナルペプチド signal_peptide:M1-A37 膜貫通ドメイン N:V452-C471 低密度リポタンパク質受容体ドメイン ldl_recept_a:H308-N346 Spcansignal_cleavage:M1-A37	BLAST_DOMO BLAST_PRODOR BLIMPS_BLOCKS BLIMPS_PRINTS HMMER HMMER_PFBAM SPSCAN

10

20

30

40

表3-7

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチドID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグナペプチド配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
					Tgf_β : I372-C387	MOTIFS

10

20

30

40

表 3-8

SEQ ID NO.	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
7	7476245CD1	121	S76		ホソバシリン様ペプチドファミリー DM00828 P08949 18-55:A18-M56 DM00828 P01297 1-31:A25-M56 ニューログリン B32 前駆体含有:塩基性残基シグナル対上での B ホソバシリンファミリーアミド化切断 PD054439:G57-K121 ニューログリン B32 以下を含む:PD026110:A25-M56 で B ホソバシリンファミリーアミド化前駆体切断 ホソバシリン様ペプチドファミリータンパク質 BL00257:R46-M56 シグナルペプチド signal_peptide:M1-D30 ホソバシリン:M50-M56 ホソバシリン様ペプチドファミリータンパク質シグネチャ ホソバシリン_prf:D30-R81 Specansignal_cleavage:M1-P26	BLAST_DOMO BLAST_PRODOM
8	5819744CD1	55	S12 S17 T2		副甲状腺ホルモンのシグネチャ 副甲状腺_prf:M1-K50 Specan_signal_peptide:M1-P51	SPSCAN PROFILESKAN SPSCAN

【表 1 2】

10

20

30

40

表 3-9

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
9	5376618CD1	545	S154 S158 S238 S345 S366 S390 S404 S405 S425 S471 S528 T188 T209 T216 T374 T518 T72	N186 N271 N402 N70	ロインリンチリポートシグネチャ PRO0019:L156-F169, L135-L148 シグナルペプチド signal_peptide: M1-A28 ロインリンチリポート LR: D62-P85, S86-F109, H110-R133, D134-D157 ロインリンチリポート C 末端ドメイン LRCT: N167-T216 SPscan signal_cleavage: M1-L23 Atp_gtp_A 結合部位: A526-T533	BLMPSPRINTS HMMER HMMER_PFAM IPSCAN MOTIFS

10

20

30

40

表4-1

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	inbyte ポリヌクレオチド ID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
10	1657368CB1	1374	1279-1374	7185657H1 (BONRECO1) 1657373H1 (URETUTU01) 2687816F6 (LUNGNOT23) 5851853H1 (FIEAUNT02) GNN_G6967325_000005_006 2304926R6 (NGANNOT01) 70032782D1 70032296D1 5498652F6 (BRABDIR01) 70503374V1 70503718V1 6608073H1 (BRAXDIC01) 70505915V1 70505907V1 6993321H1 (BRAQTR02) 705011232V1 70504786V1 70504213V1 70505588V1	32 1 833 684 199 4158 3771 3418 3659 516 2106 3063 2705 4413 1 784 1385 1997 2429	571 227 1374 942 1113 4541 4163 3776 4154 1173 2675 3519 3333 2072 561 1409 2066 2655 3132
11	4028972CB1	4541	916-2416, 1-158, 2747-3709	71281268V1 71152050V1 71154676V1 5398353T6 (LIVRTUT13) 4062433T6 (BRAINT21) 71008692V1 71234485V1 71010865V1 5647010F8 (BRAITUT23) 71009374V1 71088966V1	1 692 557 506 1798 219 1 1150 1727 978 599	631 1117 1114 1084 2460 836 590 1746 2360 1550 1085
12	5398353CB1	1117	485-916, 1-75, 990- 1117, 157-211			
13	71234118CB1	2460	2070-2175, 1-38, 1632-1726, 1395- 1534, 156-1013, 2409-2460			

10

20

30

40

【表 1 4】

表 4-2

ボリヌレオチド SEQ ID NO:	Incyte ボリヌレオチド ID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
14	240168CB1	2601	592-648, 1-45, 706-754	3227038H1 (EPIGNOTO1) 93153915 1833192H1 (BRAJNONO1) 1750805F6 (LIVRTUT01) 6764130J1 (BRAUNORO1) 1913790H1 (PROSTUS23) 6975777H1 (BRAHTDRO4) 7070876H1 (BRAUTDRO2) 7653484H1 (UTREDEMO6) GNN.G7768040.00033.002 1451206F6 (PENITUT01) GNN.G8439934.000008.002. edit.1	1348 649 2367 2189 657 2340 1357 1058 1 1618 1029	1526 1174 2601 2580 1344 2587 2035 1545 471 759 2210 2396
15	7481107CB1	2791	1-1312, 2425-2791, 1841-1883, 1598- 1658	1387140F6 (CARGDIT02) 6152346H1 (ENDMUNTO4) GBI.chr8_smoesh_4.comp 237775F6 (ISLUNOTO1) 1577577F6 (LNOONOTO3) 5813552T8 (PROSTUS23) 5813552F8 (PROSTUS23) 6718171H1 (CONDTUT02) 70656442V1 GNN.G4416547.000001.4	2188 2165 1 411 1 210 1 1805 2901 78	2791 2451 1427 709 554 753 636 2358 3413 1715
16	7476245CB1	709	651-709	826483JUI PL5378618.G4416547.G4091 819 GBI.G4416547.fasta.edit	1683 78	2349 1715
17	5819744CB1	753	1-753	70657537V1	1	201
18	5378618CB1	3413	3392-3413, 1-1039, 1696-2626	70657537V1	1	2945

10

20

30

40

【表 15】

表5

ポリ双クレオサド SEQ ID NO:	Keyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
10	1657268CB1	LJNGNOT23
11	4028972CB1	BRAIDI01
12	5398353CB1	LIVRTUT13
13	71234118CB1	PLACNOB01
14	2401688CB1	LIVRTUT01
15	7481107CB1	CARGDIT02
16	7476245CB1	BRAITUT12
17	5819744CB1	PROSTUS23
18	5378618CB1	BRSTTUT03

10

20

30

40

表 6-1

ライブラリ	バクター	ライブラリの説明
BRABDI01	PINCY	ライブラリは、脳血管事故で死亡した 57 歳の白人男性の脳から採取した腫瘍のある小脳組織の分離 RNA を使用して構築された。患者の病歴には、ハンチントン病、気腫およびニコチン中毒が見られた。
BRAITUT12	PINCY	ライブラリは、40 才の白人女性の脳腫瘍病変の切除時に、左前頭葉から採取した脳腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病歴は大円形細胞性星状細胞腫のグレード 4 を示した。
BRSTTUT03	PSPORT1	ライブラリは、片側の拡張した単純乳房切除術中の 58 才白人女性から取り除かれた乳房腫瘍組織から単離された RNA を用いて作製された。病歴は多中心性侵襲性のグレード 4 の小葉癌を示した。塊が左乳房の上方外側の四半分で同定された。また結節 3 つが下方外側の四半分で発見された。患者の病歴には皮膚癌、リュウマチ性心疾患、骨関節炎および結核がある。家族の病歴には、脳血管疾患、冠動脈瘤、乳癌、前立腺癌、アテローム硬化型冠動脈疾患及びタイプ I 糖尿病が含まれる。
CARGDI02	PINCY	ライブラリは末期骨関節炎の 4 人のドナーから得た軟骨から単離された RNA を用いて作製した。患者は様々な非ステロイド抗炎症薬を食べていた。
LIVRTUT01	PINCY	ライブラリは 51 才の白人女性の肝葉切除時に採取した肝腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病歴は結腸癌に一致した転移性グレード 3 の腺癌を示した。患者の病歴には肝臓の悪性腫瘍が含まれている。

【表 17】

10

20

30

40

冊 6-2

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
LIVRTUTL3	P1NCV	ライブラリは 62 才の白人女性の部分肝切除と診察開腹術時に採取した肝腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理は、島細胞腫と一致した転移性で中グレードの神経内分泌悪性腫瘍を示し、腫瘍は、内側と外側の左肝葉でサイズの異なる結節を形成していた。腫瘍には、偽性嚢胞と一致する、線維症、慢性炎症及び脂肪防壁死が見られた。胆嚢には軽度の慢性胆嚢炎が見られた。患者の病歴には、膵臓部の悪性腫瘍、肺萎縮症、高脂質血症、血栓静脈炎、複雑の関節における関節痛、II 型糖尿病、良性高血圧症、脳血管疾患、脳血管疾患が含まれる。家族の病歴には、脳腫瘍、二次性肝臓癌、良性高血圧症、高脂血症が見られた。
LUNGCT23	P1NCV	ライブラリは 58 才の白人男性から採取した左葉肺組織から単離した RNA を用いて作製した。関連する腫瘍組織の病理は、転移性グレード 3(4)骨肉腫を示した。患者の病歴には、軟部組織腫瘍、肺の二次性癌、前立腺癌、出血を伴う急性十二指腸潰瘍がある。家族の病歴には、前立腺癌、乳癌、急性白血症がある。
PLACNOB01	PBLJESCRIP1	ライブラリは、胎盤から単離された RNA を用いて作製された。

10

20

30

40

【表 18】

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
PROSTUS23	pINCY	<p>このサブトラクショナルライブラリは、プールの前立腺腫瘍ライブラリは、プールの前立腺組織ライブラリの 1000 万のクローンと、プールの前立腺腫瘍ライブラリの 1000 万のクローンに 2 回のサブトラクショナルライブラリライゼーションにかけられたものを用いて作製した。サブトラクショナルライブラリは、68 才 (A), 61 才 (B), 66 才 (C), および 68 才 (D) の白人男性からリンパ節切除を伴う前立腺切除術時に採取した前立腺腫瘍から単離した mRNA を用いた 4 個の前立腺腫瘍ライブラリから等しい数のクローンをプールのすることによって作製した。病理はすべてのドナーにおいて陽性を示した。病歴は、ドナー A では、PSA の上昇、硬結、およびタバコの服用。ドナー B は PSA の上昇、硬結、前立腺肥厚、腎不全、骨関節炎、腎動脈狭窄、良性の HTN、血小板減少症、高脂血症、タバコ/アルコール服用、および C 型肝炎 (保有者)。ドナー C は、PSA の上昇、硬結、およびタバコの服用。また、ドナー D は、PSA の上昇、硬結、高コレステロール血症、および腎結石である。サブトラクショナルライブラリライゼーションは、前立腺組織、前立腺上皮細胞および三人のドナーによる前立腺ストロマからの線維芽細胞から由来する 3 個の前立腺組織ライブラリから得られた同じ数の cDNA クローンをプールすることによって作製した。サブトラクショナルライブラリの条件は Swarcop ら, NAR 19 (1991):1954 および Bonaudo らの Genome Research 6 (1996):791 の方法に基づいたものである。</p>

10

20

30

40

【表 19】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連値
ABI FACTURA	ベクター配列を除き、核酸配列のまぎらわしい塩基を遮断するプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸または核酸配列の比較、注釈に有用なデータベースデータベース。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<5%
ABI ノートアセンブラ	核酸配列の構築を行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	アミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用なバージョンローカルライメント検索ツール。FASTAに似て、blastp、blastn、tblastn、tblastx、tblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. ら(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他(1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTsの確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値 = 1.0E-10以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最小5つの機能: fasta、tfasta、fastx、tfastx、tfastxおよびssearchがある。	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; 及び Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E値=1.0E-6 構築されたEST: fasta I 同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fastx E値=1.0E-8以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOMおよびPFAM データベースの配列と対応させて遺伝子ファミリー、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLOCKS IMPROVED サーチャー。	Henikoff, S. 及び J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. 及び S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; and Attwood, T.K. ら(1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値 = 1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列をPFAMのようなタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れたマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. ら(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. ら(1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. ら(1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット: 確率値 = 1.0E-3 以下 シグナルペプチド: スコア=0以上

10

20

30

40

【表 20】

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. ら.(1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. ら.(1989) Methods Enzymol.183:146-159; Bairoch, A. ら.(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質のスコアを特定のPrositeモチーフに対するGCC指定 (HIGHJ 値) 適用、スコア=1.4-2.1.
Phred	高度感受性および確立性のある自動シーケンサーレースを調べる塩基コールアルゴリズム。	Ewing, B. ら.(1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. 及び P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的実行に基づいたプログラムである、SWATとCrossMatchを含むPhils改訂構築プログラムで、配列相同性検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. 及び M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; 及び Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Conseq	Phrap 構築の表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. ら.(1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列を走査し、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重量マトリックス分析プログラム。	Nielson, H. ら.(1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M.及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重量マトリックスを使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、定位(方向)を決定するプログラム。	Persson, B. 及び P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. 及び P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れたMarkov モデル(HMM) を使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、定位(方向)を決定するプログラム。	Somnhammer, E.L. ら.(1998) Proc.Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol.Biol., Glasgow 他, eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. ら.(1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page Page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【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
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/94587 A2(51) International Patent Classification: C12N 15/16,
15/19, C07K 14/52, 14/575, 16/24, 16/26, C12Q 1/68,
A61K 38/19, 38/22, G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/US01/18476

(22) International Filing Date: 6 June 2001 (06.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/210,233 6 June 2000 (06.06.2000) US
60/213,465 23 June 2000 (23.06.2000) US
60/249,019 14 November 2000 (14.11.2000) US(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE
GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo
Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LAL, Preeti
[IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US).
YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale,
CA 94087 (US). HE, Ann [CN/US]; 4601 Catalina
Drive, San Jose, CA 95129 (US). NGUYEN, Daniel B.
[US/US]; 1403 Ridgewood Drive, San Jose, CA 95118
(US). WALLIA, Narinder [US/US]; 890 Davis Street #205,
San Leandro, CA 94577 (US). GANDHI, Ameena, R.
[US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA 94025
(US). AZIMZAI, Yalda [US/US]; 5518 Boulder Canyon
Drive, Castro Valley, CA 94552 (US). BANDMAN, Olga
[US/US]; 366 Anna Avenue, Mountain View, CA 94043
(US). TANG, X., Tom [US/US]; 4230 Ranwick Court, SanJose, CA 95118 (US). LU, Yan [US/US]; 3885 Corina
Way, Palo Alto, CA 94303 (US). BAUGHN, Mariah, R.
[US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577
(US). DUGGAN, Brendan, M. [AU/US]; 243 Buena
Vista, #306, Sunnyvale, CA 94086 (US). LEE, Sally
[US/US]; 825 East Evelyn, #425, Sunnyvale, CA 94086
(US). HAFALIA, April [US/US]; 2227 Calle de Primav-
era, Santa Clara, CA 95054 (US). POLICKY, Jennifer,
L. [US/US]; 1511 Jarvis Court, San Jose, CA 95118 (US).(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics,
Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, 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,
TI, 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 reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/94587 A2

(54) Title: EXTRACELLULAR MESSENGERS

(57) Abstract: The invention provides human extracellular messengers (XMES) and polynucleotides which identify and encode XMES. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides methods for diagnosing, treating or preventing disorders associated with aberrant expression of XMES.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

EXTRACELLULAR MESSENGERS**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of extracellular messengers and
5 to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of neurological disorders,
autoimmune/inflammatory disorders, developmental disorders, endocrine disorders, and cell
proliferative disorders including cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds
on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of extracellular messengers.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 Intercellular communication is essential for the growth and survival of multicellular
organisms, and in particular, for the function of the endocrine, nervous, and immune systems. In
addition, intercellular communication is critical for developmental processes such as tissue
construction and organogenesis, in which cell proliferation, cell differentiation, and morphogenesis
15 must be spatially and temporally regulated in a precise and coordinated manner. Cells communicate
with one another through the secretion and uptake of diverse types of signaling molecules such as
hormones, growth factors, neuropeptides, and cytokines.

Hormones

Hormones are signaling molecules that coordinately regulate basic physiological processes
20 from embryogenesis throughout adulthood. These processes include metabolism, respiration,
reproduction, excretion, fetal tissue differentiation and organogenesis, growth and development,
homeostasis, and the stress response. Hormonal secretions and the nervous system are tightly
integrated and interdependent. Hormones are secreted by endocrine glands, primarily the hypothalamus
and pituitary, the thyroid and parathyroid, the pancreas, the adrenal glands, and the ovaries and testes.

25 The secretion of hormones into the circulation is tightly controlled. Hormones are often
secreted in diurnal, pulsatile, and cyclic patterns. Hormone secretion is regulated by perturbations in
blood biochemistry, by other upstream-acting hormones, by neural impulses, and by negative feedback
loops. Blood hormone concentrations are constantly monitored and adjusted to maintain optimal,
steady-state levels. Once secreted, hormones act only on those target cells that express specific
30 receptors.

Most disorders of the endocrine system are caused by either hyposecretion or hypersecretion of
hormones. Hyposecretion often occurs when a hormone's gland of origin is damaged or otherwise
impaired. Hypersecretion often results from the proliferation of tumors derived from hormone-secreting
cells. Inappropriate hormone levels may also be caused by defects in regulatory feedback loops or in

WO 01/94587

PCT/US01/18476

the processing of hormone precursors. Endocrine malfunction may also occur when the target cell fails to respond to the hormone.

Hormones can be classified biochemically as polypeptides, steroids, eicosanoids, or amines.

Polypeptide hormones, which include diverse hormones such as insulin and growth hormone, vary in size and function and are often synthesized as inactive precursors that are processed intracellularly into mature, active forms. Amine hormones, which include epinephrine and dopamine, are amino acid derivatives that function in neuroendocrine signaling. Steroid hormones, which include the cholesterol-derived hormones estrogen and testosterone, function in sexual development and reproduction. Eicosanoid hormones, which include prostaglandins and prostacyclins, are fatty acid derivatives that function in a variety of processes. Most polypeptide hormones and some amine hormones are soluble in the circulation where they are highly susceptible to proteolytic degradation within seconds after their secretion. Steroid hormones and eicosanoid hormones are insoluble and must be transported in the circulation by carrier proteins. The following discussion will focus primarily on polypeptide hormones.

Hormones secreted by the hypothalamus and pituitary gland play a critical role in endocrine function by coordinately regulating hormonal secretions from other endocrine glands in response to neural signals. Hypothalamic hormones include thyrotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, growth-hormone releasing factor, corticotropin-releasing hormone, substance P, dopamine, and prolactin-releasing hormone. These hormones directly regulate the secretion of hormones from the anterior lobe of the pituitary. Hormones secreted by the anterior pituitary include adrenocorticotropic hormone (ACTH), melanocyte-stimulating hormone, somatotrophic hormones such as growth hormone and prolactin, glycoprotein hormones such as thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH), β -lipotropin, and β -endorphins. These hormones regulate hormonal secretions from the thyroid, pancreas, and adrenal glands, and act directly on the reproductive organs to stimulate ovulation and spermatogenesis. The posterior pituitary synthesizes and secretes antidiuretic hormone (ADH, vasopressin) and oxytocin.

Disorders of the hypothalamus and pituitary often result from lesions such as primary brain tumors, adenomas, infarction associated with pregnancy, hypophysectomy, aneurysms, vascular malformations, thrombosis, infections, immunological disorders, and complications due to head trauma. Such disorders have profound effects on the function of other endocrine glands. Disorders associated with hypopituitarism include hypogonadism, Sheehan syndrome, diabetes insipidus, Kallman's disease, Hand-Schuller-Christian disease, Letterer-Siwe disease, sarcoidosis, empty sella syndrome, and dwarfism. Disorders associated with hyperpituitarism include acromegaly, gigantism, and syndrome of inappropriate ADH secretion (SIADH), often caused by benign adenomas.

Hormones secreted by the thyroid and parathyroid primarily control metabolic rates and the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

regulation of serum calcium levels, respectively. Thyroid hormones include calcitonin, somatostatin, and thyroid hormone. The parathyroid secretes parathyroid hormone. Disorders associated with hypothyroidism include goiter, myxedema, acute thyroiditis associated with bacterial infection, subacute thyroiditis associated with viral infection, autoimmune thyroiditis (Hashimoto's disease), and cretinism. Disorders associated with hyperthyroidism include thyrotoxicosis and its various forms, Grave's disease, pretibial myxedema, toxic multinodular goiter, thyroid carcinoma, and Plummer's disease. Disorders associated with hyperparathyroidism include Conn disease (chronic hypercalcemia) leading to bone resorption and parathyroid hyperplasia.

Hormones secreted by the pancreas regulate blood glucose levels by modulating the rates of carbohydrate, fat, and protein metabolism. Pancreatic hormones include insulin, glucagon, amylin, γ -aminobutyric acid, gastrin, somatostatin, and pancreatic polypeptide. The principal disorder associated with pancreatic dysfunction is diabetes mellitus caused by insufficient insulin activity. Diabetes mellitus is generally classified as either Type I (insulin-dependent, juvenile diabetes) or Type II (non-insulin-dependent, adult diabetes). The treatment of both forms by insulin replacement therapy is well known. Diabetes mellitus often leads to acute complications such as hypoglycemia (insulin shock), coma, diabetic ketoacidosis, lactic acidosis, and chronic complications leading to disorders of the eye, kidney, skin, bone, joint, cardiovascular system, nervous system, and to decreased resistance to infection.

The anatomy, physiology, and diseases related to hormonal function are reviewed in McCance, K. L. and Huether, S. E. (1994) Pathophysiology: The Biological Basis for Disease in Adults and Children, Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO; Greenspan, F. S. and Baxter, J. D. (1994) Basic and Clinical Endocrinology, Appleton and Lange, East Norwalk, CT.

Growth Factors

Growth factors are secreted proteins that mediate intercellular communication. Unlike hormones, which travel great distances via the circulatory system, most growth factors are primarily local mediators that act on neighboring cells. Most growth factors contain a hydrophobic N-terminal signal peptide sequence which directs the growth factor into the secretory pathway. Most growth factors also undergo post-translational modifications within the secretory pathway. These modifications can include proteolysis, glycosylation, phosphorylation, and intramolecular disulfide bond formation. Once secreted, growth factors bind to specific receptors on the surfaces of neighboring target cells, and the bound receptors trigger intracellular signal transduction pathways. These signal transduction pathways elicit specific cellular responses in the target cells. These responses can include the modulation of gene expression and the stimulation or inhibition of cell division, cell differentiation, and cell motility.

Growth factors fall into at least two broad and overlapping classes. The broadest class

WO 01/94587

PCT/US01/18476

includes the large polypeptide growth factors, which are wide-ranging in their effects. These factors include epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor- β (TGF- β), insulin-like growth factor (IGF), nerve growth factor (NGF), and platelet-derived growth factor (PDGF), each defining a family of numerous related factors. The large polypeptide growth factors, with the exception of NGF, act as mitogens on diverse cell types to stimulate wound healing, bone synthesis and remodeling, extracellular matrix synthesis, and proliferation of epithelial, epidermal, and connective tissues. Members of the TGF- β , EGF, and FGF families also function as inductive signals in the differentiation of embryonic tissue. NGF functions specifically as a neurotrophic factor, promoting neuronal growth and differentiation.

Another class of growth factors includes the hematopoietic growth factors, which are narrow in their target specificity. These factors stimulate the proliferation and differentiation of blood cells such as B-lymphocytes, T-lymphocytes, erythrocytes, platelets, eosinophils, basophils, neutrophils, macrophages, and their stem cell precursors. These factors include the colony-stimulating factors (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, and CSF1-3), erythropoietin, and the cytokines. The cytokines are specialized hematopoietic factors secreted by cells of the immune system and are discussed in detail below.

Growth factors play critical roles in neoplastic transformation of cells *in vitro* and in tumor progression *in vivo*. Overexpression of the large polypeptide growth factors promotes the proliferation and transformation of cells in culture. Inappropriate expression of these growth factors by tumor cells *in vivo* may contribute to tumor vascularization and metastasis. Inappropriate activity of hematopoietic growth factors can result in anemias, leukemias, and lymphomas. Moreover, growth factors are both structurally and functionally related to oncoproteins, the potentially cancer-causing products of proto-oncogenes. Certain FGF and PDGF family members are themselves homologous to oncoproteins, whereas receptors for some members of the EGF, NGF, and FGF families are encoded by proto-oncogenes. Growth factors also affect the transcriptional regulation of both proto-oncogenes and oncosuppressor genes. (Pimentel, E. (1994) Handbook of Growth Factors, CRC Press, Ann Arbor, MI; McKay, I. and Leigh, I., eds. (1993) Growth Factors: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, NY; Habenicht, A., ed. (1990) Growth Factors, Differentiation Factors, and Cytokines, Springer-Verlag, New York, NY.)

In addition, some of the large polypeptide growth factors play crucial roles in the induction of the primordial germ layers in the developing embryo. This induction ultimately results in the formation of the embryonic mesoderm, ectoderm, and endoderm which in turn provide the framework for the entire adult body plan. Disruption of this inductive process would be catastrophic to embryonic development.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Small Peptide Factors - Neuropeptides and Vasomediators

Neuropeptides and vasomediators (NP/VM) comprise a family of small peptide factors, typically of 20 amino acids or less. These factors generally function in neuronal excitation and inhibition of vasoconstriction/vasodilation, muscle contraction, and hormonal secretions from the brain and other endocrine tissues. Included in this family are neuropeptides and neuropeptide hormones such as bombesin, neuropeptide Y, neurotensin, neuromedin N, melanocortins, opioids, galanin, somatostatin, tachykinins, urotensin II and related peptides involved in smooth muscle stimulation, vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and circulatory system-borne signaling molecules such as angiotensin, complement, calcitonin, endothelins, formyl-methionyl peptides, glucagon, cholecystokinin, gastrin, and many of the peptide hormones discussed above. NP/VMs can transduce signals directly, modulate the activity or release of other neurotransmitters and hormones, and act as catalytic enzymes in signaling cascades. The effects of NP/VMs range from extremely brief to long-lasting. (Reviewed in Martin, C. R. et al. (1985) Endocrine Physiology, Oxford University Press, New York, NY, pp. 57-62.)

15 Cytokines

Cytokines comprise a family of signaling molecules that modulate the immune system and the inflammatory response. Cytokines are usually secreted by leukocytes, or white blood cells, in response to injury or infection. Cytokines function as growth and differentiation factors that act primarily on cells of the immune system such as B- and T-lymphocytes, monocytes, macrophages, and granulocytes. Like other signaling molecules, cytokines bind to specific plasma membrane receptors and trigger intracellular signal transduction pathways which alter gene expression patterns. There is considerable potential for the use of cytokines in the treatment of inflammation and immune system disorders.

Cytokine structure and function have been extensively characterized in vitro. Most cytokines are small polypeptides of about 30 kilodaltons or less. Over 50 cytokines have been identified from human and rodent sources. Examples of cytokine subfamilies include the interferons (IFN- α , - β , and - γ), the interleukins (IL-1-IL-13), the tumor necrosis factors (TNF- α and - β), and the chemokines. Many cytokines have been produced using recombinant DNA techniques, and the activities of individual cytokines have been determined in vitro. These activities include regulation of leukocyte proliferation, differentiation, and motility.

The activity of an individual cytokine in vitro may not reflect the full scope of that cytokine's activity in vivo. Cytokines are not expressed individually in vivo but are instead expressed in combination with a multitude of other cytokines when the organism is challenged with a stimulus. Together, these cytokines collectively modulate the immune response in a manner appropriate for that particular stimulus. Therefore, the physiological activity of a cytokine is determined by the stimulus

WO 01/94587

PCT/US01/18476

itself and by complex interactive networks among co-expressed cytokines which may demonstrate both synergistic and antagonistic relationships.

Chemokines comprise a cytokine subfamily with over 30 members. (Reviewed in Wells, T. N. C. and Peitsch, M. C. (1997) *J. Leukoc. Biol.* 61:545-550.) Chemokines were initially identified as chemotactic proteins that recruit monocytes and macrophages to sites of inflammation. Recent evidence indicates that chemokines may also play key roles in hematopoiesis and HIV-1 infection. Chemokines are small proteins which range from about 6-15 kilodaltons in molecular weight. Chemokines are further classified as C, CC, CXC, or CX₃C based on the number and position of critical cysteine residues. The CC chemokines, for example, each contain a conserved motif consisting of two consecutive cysteines followed by two additional cysteines which occur downstream at 24- and 16-residue intervals, respectively (ExPASy PROSITE database, documents PS00472 and PDOC00434). The presence and spacing of these four cysteine residues are highly conserved, whereas the intervening residues diverge significantly. However, a conserved tyrosine located about 15 residues downstream of the cysteine doublet seems to be important for chemotactic activity. Most of the human genes encoding CC chemokines are clustered on chromosome 17, although there are a few examples of CC chemokine genes that map elsewhere. Other chemokines include lymphotactin (C chemokine); macrophage chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1; CC chemokine); platelet factor 4 and IL-8 (CXC chemokines); and fractalkine and neurotractin (CX₃C chemokines). (Reviewed in Luster, A. D. (1998) *N. Engl. J. Med.* 338:436-445.)

The discovery of new extracellular messengers and the polynucleotides encoding them satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis, prevention, and treatment of neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, developmental disorders, endocrine disorders, and cell proliferative disorders including cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of extracellular messengers.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, extracellular messengers, referred to collectively as "XMES" and individually as "XMES-1," "XMES-2," "XMES-3," "XMES-4," "XMES-5," "XMES-6," "XMES-7," "XMES-8," and "XMES-9." In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid

WO 01/94587

PCT/US01/18476

sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-9.

5 The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18.

10 Additionally, the invention provides a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the invention provides a cell transformed with the recombinant polynucleotide. In another alternative, the invention provides a transgenic organism comprising the recombinant polynucleotide.

15 The invention also provides a method for producing a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said cell is transformed with a recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide, and b) recovering the polypeptide so expressed.

20 Additionally, the invention provides an isolated antibody which specifically binds to a

WO 01/94587

PCT/US01/18476

polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

The invention further provides an isolated polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). In one alternative, the polynucleotide comprises at least 60 contiguous nucleotides.

Additionally, the invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and b)

WO 01/94587

PCT/US01/18476

detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.

The invention further provides a composition comprising an effective amount of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention also provides a method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting agonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) exposing a sample comprising the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

polypeptide to a compound, and b) detecting antagonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an antagonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with overexpression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under suitable conditions, and b) detecting binding of the polypeptide to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide.

The invention further provides a method of screening for a compound that modulates the activity of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound, and c) comparing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide.

The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, and b) detecting altered expression of the target polynucleotide.

The invention further provides a method for assessing toxicity of a test compound, said

WO 01/94587

PCT/US01/18476

method comprising a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound;
b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20
contiguous nucleotides of a polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide
comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, ii) a
5 naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90% identical to a
polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a
polynucleotide having a sequence complementary to i), iv) a polynucleotide complementary to the
polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Hybridization occurs under conditions
whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in
10 the biological sample, said target polynucleotide selected from the group consisting of i) a
polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NO:10-18, ii) a naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90%
identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a
polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the
15 polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Alternatively, the target polynucleotide
comprises a fragment of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of i)-v) above;
c) quantifying the amount of hybridization complex; and d) comparing the amount of hybridization
complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated
biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated
20 biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

BRIEF DESCRIPTION OF THE TABLES

Table 1 summarizes the nomenclature for the full length polynucleotide and polypeptide
sequences of the present invention.

25 Table 2 shows the GenBank identification number and annotation of the nearest GenBank
homolog for polypeptides of the invention. The probability score for the match between each
polypeptide and its GenBank homolog is also shown.

Table 3 shows structural features of polypeptide sequences of the invention, including predicted
motifs and domains, along with the methods, algorithms, and searchable databases used for analysis of
30 the polypeptides.

Table 4 lists the cDNA and/or genomic DNA fragments which were used to assemble
polynucleotide sequences of the invention, along with selected fragments of the polynucleotide
sequences.

Table 5 shows the representative cDNA library for polynucleotides of the invention.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 6 provides an appendix which describes the tissues and vectors used for construction of the cDNA libraries shown in Table 5.

Table 7 shows the tools, programs, and algorithms used to analyze the polynucleotides and polypeptides of the invention, along with applicable descriptions, references, and threshold parameters.

5

DESCRIPTION OF THE INVENTION

Before the present proteins, nucleotide sequences, and methods are described, it is understood that this invention is not limited to the particular machines, materials and methods described, as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims.

It must be noted that as used herein and in the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural reference unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, a reference to "a host cell" includes a plurality of such host cells, and a reference to "an antibody" is a reference to one or more antibodies and equivalents thereof known to those skilled in the art, and so forth.

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any machines, materials, and methods similar or equivalent to those described herein can be used to practice or test the present invention, the preferred machines, materials and methods are now described. All publications mentioned herein are cited for the purpose of describing and disclosing the cell lines, protocols, reagents and vectors which are reported in the publications and which might be used in connection with the invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

25 DEFINITIONS

"XMES" refers to the amino acid sequences of substantially purified XMES obtained from any species, particularly a mammalian species, including bovine, ovine, porcine, murine, equine, and human, and from any source, whether natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant.

The term "agonist" refers to a molecule which intensifies or mimics the biological activity of XMES. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of XMES either by directly interacting with XMES or by acting on components of the biological pathway in which XMES participates.

An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding XMES. Allelic variants may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or in

WO 01/94587

PCT/US01/18476

polypeptides whose structure or function may or may not be altered. A gene may have none, one, or many allelic variants of its naturally occurring form. Common mutational changes which give rise to allelic variants are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides.

Each of these types of changes may occur alone, or in combination with the others, one or more times in
5 a given sequence.

"Altered" nucleic acid sequences encoding XMES include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as XMES or a polypeptide with at least one functional characteristic of XMES. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of
10 the polynucleotide encoding XMES, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding XMES. The encoded protein may also be "altered," and may contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent XMES. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility,
15 hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues, as long as the biological or immunological activity of XMES is retained. For example, negatively charged amino acids may include aspartic acid and glutamic acid, and positively charged amino acids may include lysine and arginine. Amino acids with uncharged polar side chains having similar hydrophilicity values may include: asparagine and glutamine; and serine and threonine. Amino acids with uncharged side chains
20 having similar hydrophilicity values may include: leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; and phenylalanine and tyrosine.

The terms "amino acid" and "amino acid sequence" refer to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, or a fragment of any of these, and to naturally occurring or synthetic molecules. Where "amino acid sequence" is recited to refer to a sequence of a naturally occurring
25 protein molecule, "amino acid sequence" and like terms are not meant to limit the amino acid sequence to the complete native amino acid sequence associated with the recited protein molecule.

"Amplification" relates to the production of additional copies of a nucleic acid sequence. Amplification is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies well known in the art.

The term "antagonist" refers to a molecule which inhibits or attenuates the biological activity of
30 XMES. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of XMES either by directly interacting with XMES or by acting on components of the biological pathway in which XMES participates.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

The term "antibody" refers to intact immunoglobulin molecules as well as to fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, and Fv fragments, which are capable of binding an epitopic determinant. Antibodies that bind XMEs polypeptides can be prepared using intact polypeptides or using fragments containing small peptides of interest as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal (e.g., a mouse, a rat, or a rabbit) can be derived from the translation of RNA, or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin (KLH). The coupled peptide is then used to immunize the animal.

The term "antigenic determinant" refers to that region of a molecule (i.e., an epitope) that makes contact with a particular antibody. When a protein or a fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the production of antibodies which bind specifically to antigenic determinants (particular regions or three-dimensional structures on the protein). An antigenic determinant may compete with the intact antigen (i.e., the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

The term "antisense" refers to any composition capable of base-pairing with the "sense" (coding) strand of a specific nucleic acid sequence. Antisense compositions may include DNA; RNA; peptide nucleic acid (PNA); oligonucleotides having modified backbone linkages such as phosphorothioates, methylphosphonates, or benzylphosphonates; oligonucleotides having modified sugar groups such as 2'-methoxyethyl sugars or 2'-methoxyethoxy sugars; or oligonucleotides having modified bases such as 5-methyl cytosine, 2'-deoxyuracil, or 7-deaza-2'-deoxyguanosine. Antisense molecules may be produced by any method including chemical synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary antisense molecule base-pairs with a naturally occurring nucleic acid sequence produced by the cell to form duplexes which block either transcription or translation. The designation "negative" or "minus" can refer to the antisense strand, and the designation "positive" or "plus" can refer to the sense strand of a reference DNA molecule.

The term "biologically active" refers to a protein having structural, regulatory, or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" or "immunogenic" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic XMEs, or of any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

"Complementary" describes the relationship between two single-stranded nucleic acid sequences that anneal by base-pairing. For example, 5'-AGT-3' pairs with its complement, 3'-TCA-5'.

A "composition comprising a given polynucleotide sequence" and a "composition comprising a

WO 01/94587

PCT/US01/18476

given amino acid sequence" refer broadly to any composition containing the given polynucleotide or amino acid sequence. The composition may comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequences encoding XMES or fragments of XMES may be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be associated with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be deployed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents (e.g., sodium dodecyl sulfate; SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

"Consensus sequence" refers to a nucleic acid sequence which has been subjected to repeated DNA sequence analysis to resolve uncalled bases, extended using the XL-PCR kit (Applied Biosystems, Foster City CA) in the 5' and/or the 3' direction, and resequenced, or which has been assembled from one or more overlapping cDNA, EST, or genomic DNA fragments using a computer program for fragment assembly, such as the GELVIEW fragment assembly system (GCG, Madison WI) or Phrap (University of Washington, Seattle WA). Some sequences have been both extended and assembled to produce the consensus sequence.

"Conservative amino acid substitutions" are those substitutions that are predicted to least interfere with the properties of the original protein, i.e., the structure and especially the function of the protein is conserved and not significantly changed by such substitutions. The table below shows amino acids which may be substituted for an original amino acid in a protein and which are regarded as conservative amino acid substitutions.

	Original Residue	Conservative Substitution
20	Ala	Gly, Ser
	Arg	His, Lys
	Asn	Asp, Gln, His
	Asp	Asn, Glu
25	Cys	Ala, Ser
	Gln	Asn, Glu, His
	Glu	Asp, Gln, His
	Gly	Ala
	His	Asn, Arg, Gln, Glu
30	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
35	Ser	Cys, Thr
	Thr	Ser, Val
	Trp	Phe, Tyr
	Tyr	His, Phe, Trp
40	Val	Ile, Leu, Thr

Conservative amino acid substitutions generally maintain (a) the structure of the polypeptide

WO 01/94587

PCT/US01/18476

backbone in the area of the substitution, for example, as a beta sheet or alpha helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the site of the substitution, and/or (c) the bulk of the side chain.

5 A "deletion" refers to a change in the amino acid or nucleotide sequence that results in the absence of one or more amino acid residues or nucleotides.

The term "derivative" refers to a chemically modified polynucleotide or polypeptide. Chemical modifications of a polynucleotide can include, for example, replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, hydroxyl, or amino group. A derivative polynucleotide encodes a polypeptide which retains at least one biological or immunological function of the natural molecule. A derivative polypeptide is one modified
10 by glycosylation, pegylation, or any similar process that retains at least one biological or immunological function of the polypeptide from which it was derived.

A "detectable label" refers to a reporter molecule or enzyme that is capable of generating a measurable signal and is covalently or noncovalently joined to a polynucleotide or polypeptide.

"Differential expression" refers to increased or upregulated; or decreased, downregulated, or
15 absent gene or protein expression, determined by comparing at least two different samples. Such comparisons may be carried out between, for example, a treated and an untreated sample, or a diseased and a normal sample.

A "fragment" is a unique portion of XMES or the polynucleotide encoding XMES which is identical in sequence to but shorter in length than the parent sequence. A fragment may comprise up
20 to the entire length of the defined sequence, minus one nucleotide/amino acid residue. For example, a fragment may comprise from 5 to 1000 contiguous nucleotides or amino acid residues. A fragment used as a probe, primer, antigen, therapeutic molecule, or for other purposes, may be at least 5, 10, 15, 16, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 150, 250 or at least 500 contiguous nucleotides or amino acid residues in length. Fragments may be preferentially selected from certain regions of a molecule. For
25 example, a polypeptide fragment may comprise a certain length of contiguous amino acids selected from the first 250 or 500 amino acids (or first 25% or 50%) of a polypeptide as shown in a certain defined sequence. Clearly these lengths are exemplary, and any length that is supported by the specification, including the Sequence Listing, tables, and figures, may be encompassed by the present embodiments.

30 A fragment of SEQ ID NO:10-18 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:10-18, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:10-18 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:10-18 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ

WO 01/94587

PCT/US01/18476

ID NO:10-18 and the region of SEQ ID NO:10-18 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-9 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:10-18. A fragment of SEQ ID NO:1-9 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-9. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-9 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-9. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-9 and the region of SEQ ID NO:10-18 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A "full length" polynucleotide sequence is one containing at least a translation initiation codon (e.g., methionine) followed by an open reading frame and a translation termination codon. A "full length" polynucleotide sequence encodes a "full length" polypeptide sequence.

"Homology" refers to sequence similarity or, interchangeably, sequence identity, between two or more polynucleotide sequences or two or more polypeptide sequences.

The terms "percent identity" and "% identity," as applied to polynucleotide sequences, refer to the percentage of residue matches between at least two polynucleotide sequences aligned using a standardized algorithm. Such an algorithm may insert, in a standardized and reproducible way, gaps in the sequences being compared in order to optimize alignment between two sequences, and therefore achieve a more meaningful comparison of the two sequences.

Percent identity between polynucleotide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment program. This program is part of the LASERGENE software package, a suite of molecular biological analysis programs (DNASTAR, Madison WI). CLUSTAL V is described in Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 and in Higgins, D.G. et al. (1992) CABIOS 8:189-191.

For pairwise alignments of polynucleotide sequences, the default parameters are set as follows: Ktuple=2, gap penalty=5, window=4, and "diagonals saved"=4. The "weighted" residue weight table is selected as the default. Percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polynucleotide sequences.

Alternatively, a suite of commonly used and freely available sequence comparison algorithms is provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), which is available from several sources, including the NCBI, Bethesda, MD, and on the Internet at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. The BLAST software suite includes various sequence analysis programs including "blastn," that is used to align a known polynucleotide sequence with other

WO 01/94587

PCT/US01/18476

polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2 Sequences" that is used for direct pairwise comparison of two nucleotide sequences. "BLAST 2 Sequences" can be accessed and used interactively at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gor/bl2.html>. The "BLAST 2 Sequences" tool can be used for both blastn and blastp (discussed below). BLAST programs are commonly used with gap and other parameters set to default settings. For example, to compare two nucleotide sequences, one may use blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1
10 *Penalty for mismatch: -2*
Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 11
15 *Filter: on*

Percent identity may be measured over the length of an entire defined sequence, for example, as defined by a particular SEQ ID number, or may be measured over a shorter length, for example, over the length of a fragment taken from a larger, defined sequence, for instance, a fragment of at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 70, at least 100, or at least 200 contiguous nucleotides. Such lengths are exemplary only, and it is understood that any fragment length supported by the sequences shown herein, in the tables, figures, or Sequence Listing, may be used to describe a length over which percentage identity may be measured.

Nucleic acid sequences that do not show a high degree of identity may nevertheless encode similar amino acid sequences due to the degeneracy of the genetic code. It is understood that changes in a nucleic acid sequence can be made using this degeneracy to produce multiple nucleic acid sequences that all encode substantially the same protein.

The phrases "percent identity" and "% identity," as applied to polypeptide sequences, refer to the percentage of residue matches between at least two polypeptide sequences aligned using a standardized algorithm. Methods of polypeptide sequence alignment are well-known. Some alignment methods take into account conservative amino acid substitutions. Such conservative substitutions, explained in more detail above, generally preserve the charge and hydrophobicity at the site of substitution, thus preserving the structure (and therefore function) of the polypeptide.

Percent identity between polypeptide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment

WO 01/94587

PCT/US01/18476

program (described and referenced above). For pairwise alignments of polypeptide sequences using CLUSTAL V, the default parameters are set as follows: Ktuple=1, gap penalty=3, window=5, and "diagonals saved"=5. The PAM250 matrix is selected as the default residue weight table. As with polynucleotide alignments, the percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polypeptide sequence pairs.

Alternatively the NCBI BLAST software suite may be used. For example, for a pairwise comparison of two polypeptide sequences, one may use the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) with blastp set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62
Open Gap: 11 and Extension Gap: 1 penalties
Gap x drop-off: 50
Expect: 10
Word Size: 3
Filter: on

Percent identity may be measured over the length of an entire defined polypeptide sequence, for example, as defined by a particular SEQ ID number, or may be measured over a shorter length, for example, over the length of a fragment taken from a larger, defined polypeptide sequence, for instance, a fragment of at least 15, at least 20, at least 30, at least 40, at least 50, at least 70 or at least 150 contiguous residues. Such lengths are exemplary only, and it is understood that any fragment length supported by the sequences shown herein, in the tables, figures or Sequence Listing, may be used to describe a length over which percentage identity may be measured.

"Human artificial chromosomes" (HACs) are linear microchromosomes which may contain DNA sequences of about 6 kb to 10 Mb in size and which contain all of the elements required for chromosome replication, segregation and maintenance.

The term "humanized antibody" refers to an antibody molecule in which the amino acid sequence in the non-antigen binding regions has been altered so that the antibody more closely resembles a human antibody, and still retains its original binding ability.

"Hybridization" refers to the process by which a polynucleotide strand anneals with a complementary strand through base pairing under defined hybridization conditions. Specific hybridization is an indication that two nucleic acid sequences share a high degree of complementarity. Specific hybridization complexes form under permissive annealing conditions and remain hybridized after the "washing" step(s). The washing step(s) is particularly important in determining the stringency of the hybridization process, with more stringent conditions allowing less non-specific binding, i.e., binding between pairs of nucleic acid strands that are not perfectly matched. Permissive conditions for

WO 01/94587

PCT/US01/18476

annealing of nucleic acid sequences are routinely determinable by one of ordinary skill in the art and may be consistent among hybridization experiments, whereas wash conditions may be varied among experiments to achieve the desired stringency, and therefore hybridization specificity. Permissive annealing conditions occur, for example, at 68°C in the presence of about 6 x SSC, about 1% (w/v) SDS, and about 100 µg/ml sheared, denatured salmon sperm DNA.

5 Generally, stringency of hybridization is expressed, in part, with reference to the temperature under which the wash step is carried out. Such wash temperatures are typically selected to be about 5°C to 20°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 and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. An equation for calculating T_m and conditions for nucleic acid hybridization are well known and can be found in Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; specifically see volume 2, chapter 9.

15 High stringency conditions for hybridization between polynucleotides of the present invention include wash conditions of 68°C in the presence of about 0.2 x SSC and about 0.1% SDS, for 1 hour. Alternatively, temperatures of about 65°C, 60°C, 55°C, or 42°C may be used. SSC concentration may be varied from about 0.1 to 2 x SSC, with SDS being present at about 0.1%. Typically, blocking reagents are used to block non-specific hybridization. Such blocking reagents include, for instance, sheared and denatured salmon sperm DNA at about 100-200 µg/ml. Organic solvent, such as 20 formamide at a concentration of about 35-50% v/v, may also be used under particular circumstances, such as for RNA:DNA hybridizations. Useful variations on these wash conditions will be readily apparent to those of ordinary skill in the art. Hybridization, particularly under high stringency conditions, may be suggestive of evolutionary similarity between the nucleotides. Such similarity is strongly indicative of a similar role for the nucleotides and their encoded polypeptides.

25 The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary bases. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., C_{ot} or R_{ot} analysis) or formed between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., paper, membranes, filters, chips, pins or glass slides, or any other appropriate substrate to which cells or their nucleic acids have been fixed).

The words "insertion" and "addition" refer to changes in an amino acid or nucleotide sequence resulting in the addition of one or more amino acid residues or nucleotides, respectively.

"Immune response" can refer to conditions associated with inflammation, trauma, immune disorders, or infectious or genetic disease, etc. These conditions can be characterized by expression of

WO 01/94587

PCT/US01/18476

various factors, e.g., cytokines, chemokines, and other signaling molecules, which may affect cellular and systemic defense systems.

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of XMES which is capable of eliciting an immune response when introduced into a living organism, for example, a mammal. The term "immunogenic fragment" also includes any polypeptide or oligopeptide fragment of XMES which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

The term "microarray" refers to an arrangement of a plurality of polynucleotides, polypeptides, or other chemical compounds on a substrate.

The terms "element" and "array element" refer to a polynucleotide, polypeptide, or other chemical compound having a unique and defined position on a microarray.

The term "modulate" refers to a change in the activity of XMES. For example, modulation may cause an increase or a decrease in protein activity, binding characteristics, or any other biological, functional, or immunological properties of XMES.

The phrases "nucleic acid" and "nucleic acid sequence" refer to a nucleotide, oligonucleotide, polynucleotide, or any fragment thereof. These phrases also refer to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single-stranded or double-stranded and may represent the sense or the antisense strand, to peptide nucleic acid (PNA), or to any DNA-like or RNA-like material.

"Operably linked" refers to the situation in which a first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with a second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Operably linked DNA sequences may be in close proximity or contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, in the same reading frame.

"Peptide nucleic acid" (PNA) refers to an antisense molecule or anti-gene agent which comprises an oligonucleotide of at least about 5 nucleotides in length linked to a peptide backbone of amino acid residues ending in lysine. The terminal lysine confers solubility to the composition. PNAs preferentially bind complementary single stranded DNA or RNA and stop transcript elongation, and may be pegylated to extend their lifespan in the cell.

"Post-translational modification" of an XMES may involve lipidation, glycosylation, phosphorylation, acetylation, racemization, proteolytic cleavage, and other modifications known in the art. These processes may occur synthetically or biochemically. Biochemical modifications will vary by cell type depending on the enzymatic milieu of XMES.

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding XMES, their complements, or fragments thereof, which are used to detect identical, allelic or related nucleic acid sequences. Probes are isolated oligonucleotides or polynucleotides attached to a detectable label or reporter molecule. Typical

WO 01/94587

PCT/US01/18476

labels include radioactive isotopes, ligands, chemiluminescent agents, and enzymes. "Primers" are short nucleic acids, usually DNA oligonucleotides, which may be annealed to a target polynucleotide by complementary base-pairing. The primer may then be extended along the target DNA strand by a DNA polymerase enzyme. Primer pairs can be used for amplification (and identification) of a nucleic acid sequence, e.g., by the polymerase chain reaction (PCR).

Probes and primers as used in the present invention typically comprise at least 15 contiguous nucleotides of a known sequence. In order to enhance specificity, longer probes and primers may also be employed, such as probes and primers that comprise at least 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, or at least 150 consecutive nucleotides of the disclosed nucleic acid sequences. Probes and primers may be considerably longer than these examples, and it is understood that any length supported by the specification, including the tables, figures, and Sequence Listing, may be used.

Methods for preparing and using probes and primers are described in the references, for example Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY; Ausubel, F.M. et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY; Innis, M. et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego CA. PCR primer pairs can be derived from a known sequence, for example, by using computer programs intended for that purpose such as Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA).

Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection programs may also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing selection of primers that

WO 01/94587

PCT/US01/18476

hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved oligonucleotides and polynucleotide fragments. The oligonucleotides and polynucleotide fragments identified by any of the above selection methods are useful in hybridization technologies, for example, as PCR or sequencing
5 primers, microarray elements, or specific probes to identify fully or partially complementary polynucleotides in a sample of nucleic acids. Methods of oligonucleotide selection are not limited to those described above.

A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two or more otherwise separated segments of sequence.
10 This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques such as those described in Sambrook, *supra*. The term recombinant includes nucleic acids that have been altered solely by addition, substitution, or deletion of a portion of the nucleic acid. Frequently, a recombinant nucleic acid may include a nucleic acid sequence operably linked to a promoter sequence.
15 Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to transform a cell.

Alternatively, such recombinant nucleic acids may be part of a viral vector, e.g., based on a vaccinia virus, that could be used to vaccinate a mammal wherein the recombinant nucleic acid is expressed, inducing a protective immunological response in the mammal.

A "regulatory element" refers to a nucleic acid sequence usually derived from untranslated
20 regions of a gene and includes enhancers, promoters, introns, and 5' and 3' untranslated regions (UTRs). Regulatory elements interact with host or viral proteins which control transcription, translation, or RNA stability.

"Reporter molecules" are chemical or biochemical moieties used for labeling a nucleic acid, amino acid, or antibody. Reporter molecules include radionuclides; enzymes; fluorescent,
25 chemiluminescent, or chromogenic agents; substrates; cofactors; inhibitors; magnetic particles; and other moieties known in the art.

An "RNA equivalent," in reference to a DNA sequence, is composed of the same linear sequence of nucleotides as the reference DNA sequence with the exception that all occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the sugar backbone is composed of ribose
30 instead of deoxyribose.

The term "sample" is used in its broadest sense. A sample suspected of containing XMES, nucleic acids encoding XMES, or fragments thereof may comprise a bodily fluid; an extract from a cell, chromosome, organelle, or membrane isolated from a cell; a cell; genomic DNA, RNA, or cDNA, in solution or bound to a substrate; a tissue; a tissue print; etc.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

The terms "specific binding" and "specifically binding" refer to that interaction between a protein or peptide and an agonist, an antibody, an antagonist, a small molecule, or any natural or synthetic binding composition. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure of the protein, e.g., the antigenic determinant or epitope, recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A," the presence of a polypeptide comprising the epitope A, or the presence of free unlabeled A, in a reaction containing free labeled A and the antibody will reduce the amount of labeled A that binds to the antibody.

The term "substantially purified" refers to nucleic acid or amino acid sequences that are removed from their natural environment and are isolated or separated, and are at least 60% free, preferably at least 75% free, and most preferably at least 90% free from other components with which they are naturally associated.

A "substitution" refers to the replacement of one or more amino acid residues or nucleotides by different amino acid residues or nucleotides, respectively.

"Substrate" refers to any suitable rigid or semi-rigid support including membranes, filters, chips, slides, wafers, fibers, magnetic or nonmagnetic beads, gels, tubing, plates, polymers, microparticles and capillaries. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polymucleotides or polypeptides are bound.

A "transcript image" refers to the collective pattern of gene expression by a particular cell type or tissue under given conditions at a given time.

"Transformation" describes a process by which exogenous DNA is introduced into a recipient cell. Transformation may occur under natural or artificial conditions according to various methods well known in the art, and may rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method for transformation is selected based on the type of host cell being transformed and may include, but is not limited to, bacteriophage or viral infection, electroporation, heat shock, lipofection, and particle bombardment. The term "transformed cells" includes stably transformed cells in which the inserted DNA is capable of replication either as an autonomously replicating plasmid or as part of the host chromosome, as well as transiently transformed cells which express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

A "transgenic organism," as used herein, is any organism, including but not limited to animals and plants, in which one or more of the cells of the organism contains heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in

WO 01/94587

PCT/US01/18476

in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. The transgenic organisms contemplated in accordance with the present invention include bacteria, cyanobacteria, fungi, plants and animals. The isolated DNA of the present invention can be introduced into the host by methods known in the art, for example infection, transfection, transformation or transconjugation. Techniques for transferring the DNA of the present invention into such organisms are widely known and provided in references such as Sambrook et al. (1989), supra.

A "variant" of a particular nucleic acid sequence is defined as a nucleic acid sequence having at least 40% sequence identity to the particular nucleic acid sequence over a certain length of one of the nucleic acid sequences using blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of nucleic acids may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length. A variant may be described as, for example, an "allelic" (as defined above), "splice," "species," or "polymorphic" variant. A splice variant may have significant identity to a reference molecule, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to alternative splicing of exons during mRNA processing. The corresponding polypeptide may possess additional functional domains or lack domains that are present in the reference molecule. Species variants are polynucleotide sequences that vary from one species to another. The resulting polypeptides will generally have significant amino acid identity relative to each other. A polymorphic variant is a variation in the polynucleotide sequence of a particular gene between individuals of a given species. Polymorphic variants also may encompass "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) in which the polynucleotide sequence varies by one nucleotide base. The presence of SNPs may be indicative of, for example, a certain population, a disease state, or a propensity for a disease state.

A "variant" of a particular polypeptide sequence is defined as a polypeptide sequence having at least 40% sequence identity to the particular polypeptide sequence over a certain length of one of the polypeptide sequences using blastp with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of polypeptides may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater sequence identity over a certain defined length of one of the polypeptides.

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human extracellular messengers (XMES), the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

polynucleotides encoding XMES, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, developmental disorders, endocrine disorders, and cell proliferative disorders including cancer.

Table 1 summarizes the nomenclature for the full length polynucleotide and polypeptide sequences of the invention. Each polynucleotide and its corresponding polypeptide are correlated to a single Incyte project identification number (Incyte Project ID). Each polypeptide sequence is denoted by both a polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and an Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) as shown. Each polynucleotide sequence is denoted by both a polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and an Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) as shown.

Table 2 shows sequences with homology to the polypeptides of the invention as identified by BLAST analysis against the GenBank protein (genpept) database. Columns 1 and 2 show the polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for polypeptides of the invention. Column 3 shows the GenBank identification number (Genbank ID NO:) of the nearest GenBank homolog. Column 4 shows the probability score for the match between each polypeptide and its GenBank homolog. Column 5 shows the annotation of the GenBank homolog along with relevant citations where applicable, all of which are expressly incorporated by reference herein.

Table 3 shows various structural features of the polypeptides of the invention. Columns 1 and 2 show the polypeptide sequence identification number (SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for each polypeptide of the invention. Column 3 shows the number of amino acid residues in each polypeptide. Column 4 shows potential phosphorylation sites, and column 5 shows potential glycosylation sites, as determined by the MOTIFS program of the GCG sequence analysis software package (Genetics Computer Group, Madison WI). Column 6 shows amino acid residues comprising signature sequences, domains, and motifs. Column 7 shows analytical methods for protein structure/function analysis and in some cases, searchable databases to which the analytical methods were applied.

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of polypeptides of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are extracellular messengers. For example, SEQ ID NO:2 is 96% identical, over 1210 amino acids, to rat neurexin III-alpha (GenBank ID g394600) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 0.0, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. Based on this analysis, SEQ ID NO:2 is a human neurexin. In an alternative example, SEQ ID NO:1 is 39% identical over 240 amino acids to mac25 (g3721617) (a protein which

WO 01/94587

PCT/US01/18476

binds the class of proteins known as insulin-like growth factors) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The probability score is $3.3e-42$ (see Table 2). In an additional alternative example, SEQ ID NO:3 is 39% identical, to human fibroblast growth factor 19 (GenBank ID g4514718) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The

5 BLAST probability score is $1.5e-22$, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:3 also contains a fibroblast growth factor domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from

· BLIMPS and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:3 is a

10 fibroblast growth factor. In another alternative example, SEQ ID NO:6 is 81% identical to Bos taurus cartilage-derived morphogenetic protein (GenBank ID g632490) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is $7.5e-185$, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID

15 NO:6 also contains a TGF-beta propeptide domain and a TGF-beta-like domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS analysis provides further corroborative evidence that SEQ ID NO:6 is a TGF-beta family protein. SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:9 were analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-9 are described in Table 7.

20 As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were assembled using cDNA sequences or coding (exon) sequences derived from genomic DNA, or any combination of these two types of sequences. Columns 1 and 2 list the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) for each polynucleotide of the invention.

25 Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:10-18 or that distinguish between SEQ ID NO:10-18 and related polynucleotide sequences. Column 5 shows identification numbers corresponding to cDNA sequences, coding sequences (exons) predicted from genomic DNA, and/or sequence assemblages

30 comprised of both cDNA and genomic DNA. These sequences were used to assemble the full length polynucleotide sequences of the invention. Columns 6 and 7 of Table 4 show the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences in column 5 relative to their respective full length sequences.

The identification numbers in Column 5 of Table 4 may refer specifically, for example, to

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. Incyte cDNAs for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries (e.g., 70656442V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to GenBank cDNAs or ESTs (e.g., g3153915) which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences. Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to coding regions predicted by Genscan analysis of genomic DNA. For example, GNN.g7768040_000033_002 is the identification number of a Genscan-predicted coding sequence, with g7768040 being the GenBank identification number of the sequence to which Genscan was applied. The Genscan-predicted coding sequences may have been edited prior to assembly. (See Example IV.) Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching" algorithm. (See Example V.) Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example, FL5378618_g4416547_g4091819 is the identification number of a "stretched" sequence, with 5378618 being the Incyte project identification number, g4416547 being the GenBank identification number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching" algorithm was applied, and g4091819 being the GenBank identification number of the nearest GenBank protein homolog. (See Example V.) In some cases, Incyte cDNA coverage redundant with the sequence coverage shown in column 5 was obtained to confirm the final consensus polynucleotide sequence, but the relevant Incyte cDNA identification numbers are not shown.

Table 5 shows the representative cDNA libraries for those full length polynucleotide sequences which were assembled using Incyte cDNA sequences. The representative cDNA library is the Incyte cDNA library which is most frequently represented by the Incyte cDNA sequences which were used to assemble and confirm the above polynucleotide sequences. The tissues and vectors which were used to construct the cDNA libraries shown in Table 5 are described in Table 6.

The invention also encompasses XMES variants. A preferred XMES variant is one which has at least about 80%, or alternatively at least about 90%, or even at least about 95% amino acid sequence identity to the XMES amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of XMES.

The invention also encompasses polynucleotides which encode XMES. In a particular embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, which encodes XMES. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:10-18, as presented in the Sequence Listing, embrace the equivalent RNA sequences, wherein occurrences of the nitrogenous base thymine are replaced with uracil, and the sugar backbone is composed of ribose instead of deoxyribose.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

The invention also encompasses a variant of a polynucleotide sequence encoding XMES. In particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding XMES. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a polynucleotide
5 sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18 which has at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of XMES.

10 It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic code, a multitude of polynucleotide sequences encoding XMES, some bearing minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in
15 accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of naturally occurring XMES, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode XMES and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring XMES under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding XMES or
20 its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring codons. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding XMES and its derivatives without altering the encoded amino acid sequences include
25 the production of RNA transcripts having more desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring sequence.

The invention also encompasses production of DNA sequences which encode XMES and XMES derivatives, or fragments thereof, entirely by synthetic chemistry. After production, the synthetic sequence may be inserted into any of the many available expression vectors and cell systems
30 using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into a sequence encoding XMES or any fragment thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed polynucleotide sequences, and, in particular, to those shown in SEQ ID NO:10-18 and fragments thereof under various conditions of stringency. (See, e.g., Wahl, G.M. and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507-511.) Hybridization conditions, including annealing and wash conditions, are described in "Definitions."

Methods for DNA sequencing are well known in the art and may be used to practice any of the
5 embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of
DNA polymerase I, SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH), Taq polymerase (Applied
Biosystems), thermostable T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ), or
combinations of polymerases and proofreading exonucleases such as those found in the ELONGASE
amplification system (Life Technologies, Gaithersburg MD). Preferably, sequence preparation is
10 automated with machines such as the MICROLAB 2200 liquid transfer system (Hamilton, Reno NV),
PTC200 thermal cycler (MJ Research, Watertown MA) and *ABI CATALYST 800 thermal cycler*
(Applied Biosystems). Sequencing is then carried out using either the ABI 373 or 377 DNA sequencing
system (Applied Biosystems), the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics,
Sunnyvale CA), or other systems known in the art. The resulting sequences are analyzed using a
15 variety of algorithms which are well known in the art. (See, e.g., Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols
in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, unit 7.7; Meyers, R.A. (1995) Molecular
Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, pp. 856-853.)

The nucleic acid sequences encoding XMES may be extended utilizing a partial nucleotide
sequence and employing various PCR-based methods known in the art to detect upstream sequences,
20 such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed,
restriction-site PCR, uses universal and nested primers to amplify unknown sequence from genomic
DNA within a cloning vector. (See, e.g., Sarkar, G. (1993) *PCR Methods Applic.* 2:318-322.)
Another method, inverse PCR, uses primers that extend in divergent directions to amplify unknown
sequence from a circularized template. The template is derived from restriction fragments comprising a
25 known genomic locus and surrounding sequences. (See, e.g., Triglia, T. et al. (1988) *Nucleic Acids*
Res. 16:8186.) A third method, capture PCR, involves PCR amplification of DNA fragments adjacent
to known sequences in human and yeast artificial chromosome DNA. (See, e.g., Lagerstrom, M. et al.
(1991) *PCR Methods Applic.* 1:111-119.) In this method, multiple restriction enzyme digestions and
ligations may be used to insert an engineered double-stranded sequence into a region of unknown
30 sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences
are known in the art. (See, e.g., Parker, J.D. et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:3055-3060).
Additionally, one may use PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (Clontech, Palo
Alto CA) to walk genomic DNA. This procedure avoids the need to screen libraries and is useful in
finding intron/exon junctions. For all PCR-based methods, primers may be designed using

WO 01/94587

PCT/US01/18476

commercially available software, such as OLIGO 4.06 primer analysis software (National Biosciences, Plymouth MN) or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the template at temperatures of about 68°C to 72°C.

5 When screening for full length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. In addition, random-primed libraries, which often include sequences containing the 5' regions of genes, are preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries may be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

10 Capillary electrophoresis systems which are commercially available may be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of sequencing or PCR products. In particular, capillary sequencing may employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different nucleotide-specific, laser-stimulated fluorescent dyes, and a charge coupled device camera for detection of the emitted wavelengths. Output/light intensity may be converted to electrical signal using appropriate software (e.g., GENOTYPER and SEQUENCE NAVIGATOR, Applied Biosystems), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display may be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for sequencing small DNA fragments which may be present in limited amounts in a particular sample.

15 In another embodiment of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode XMES may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of XMES, or fragments or functional equivalents thereof, in appropriate host cells. Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence may be produced and used to express XMES.

20 The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter XMES-encoding sequences for a variety of purposes including, but not limited to, modification of the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides may be used to engineer the nucleotide sequences. For example, oligonucleotide-mediated site-directed mutagenesis may be used to introduce mutations that create new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, and so forth.

30 The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; and Cramer, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) to alter or

WO 01/94587

PCT/US01/18476

improve the biological properties of XMES, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of DNA shuffling and selection/screening. Thus, genetic diversity is created through "artificial" breeding and rapid molecular evolution. For example, fragments of a single gene containing random point mutations may be recombined, screened, and then reshuffled until the desired properties are optimized. Alternatively, fragments of a given gene may be recombined with fragments of homologous genes in the same gene family, either from the same or different species, thereby maximizing the genetic diversity of multiple naturally occurring genes in a directed and controllable manner.

In another embodiment, sequences encoding XMES may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art. (See, e.g., Caruthers, M.H. et al. (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 7:215-223; and Horn, T. et al. (1980) *Nucleic Acids Symp. Ser.* 7:225-232.) Alternatively, XMES itself or a fragment thereof may be synthesized using chemical methods. For example, peptide synthesis can be performed using various solution-phase or solid-phase techniques. (See, e.g., Creighton, T. (1984) *Proteins, Structures and Molecular Properties*, WH Freeman, New York NY, pp. 55-60; and Roberge, J.Y. et al. (1995) *Science* 269:202-204.) Automated synthesis may be achieved using the ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems). Additionally, the amino acid sequence of XMES, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide or a polypeptide having a sequence of a naturally occurring polypeptide.

The peptide may be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography. (See, e.g., Chiez, R.M. and F.Z. Regnier (1990) *Methods Enzymol.* 182:392-421.) The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or by sequencing. (See, e.g., Creighton, *supra*, pp. 28-53.)

In order to express a biologically active XMES, the nucleotide sequences encoding XMES or derivatives thereof may be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for transcriptional and translational control of the inserted coding sequence in a suitable host. These elements include regulatory sequences, such as enhancers, constitutive and inducible promoters, and 5' and 3' untranslated regions in the vector and in polynucleotide sequences encoding XMES. Such elements may vary in their strength and specificity. Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding XMES. Such signals

WO 01/94587

PCT/US01/18476

include the ATG initiation codon and adjacent sequences, e.g. the Kozak sequence. In cases where sequences encoding XMES and its initiation codon and upstream regulatory sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals including an in-frame ATG initiation codon should be provided by the vector. Exogenous translational elements and initiation codons may be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate for the particular host cell system used. (See, e.g., Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162.)

10 Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding XMES and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. (See, e.g., Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, ch. 4, 8, and 16-17; Ausubel, F.M. et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, ch. 9, 13, and 16.)

15 A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding XMES. These include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with viral expression vectors (e.g., baculovirus); 20 plant cell systems transformed with viral expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV, or tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., T1 or pBR322 plasmids); or animal cell systems. (See, e.g., Sambrook, supra; Ausubel, supra; Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509; Engelhard, E.K. et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:1937-1945; Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311; The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196; Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659; and Harrington, J.J. et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355.) Expression vectors derived from retroviruses, adenoviruses, or herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids, may be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue, or cell population. (See, e.g., Di 30 Nicola, M. et al. (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356; Yu, M. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344; Buller, R.M. et al. (1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P. et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226; and Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242.) The invention is not limited by the host cell employed.

In bacterial systems, a number of cloning and expression vectors may be selected depending

WO 01/94587

PCT/US01/18476

upon the use intended for polynucleotide sequences encoding XMES. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding XMES can be achieved using a multifunctional *E. coli* vector such as PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) or PSPORT1 plasmid (Life Technologies). Ligation of sequences encoding XMES into the vector's multiple cloning site
5 disrupts the *lacZ* gene, allowing a colorimetric screening procedure for identification of transformed bacteria containing recombinant molecules. In addition, these vectors may be useful for in vitro transcription, dideoxy sequencing, single strand rescue with helper phage, and creation of nested deletions in the cloned sequence. (See, e.g., Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509.) When large quantities of XMES are needed, e.g. for the production of antibodies,
10 vectors which direct high level expression of XMES may be used. For example, vectors containing the strong, inducible SP6 or T7 bacteriophage promoter may be used.

Yeast expression systems may be used for production of XMES. A number of vectors containing constitutive or inducible promoters, such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH promoters, may be used in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris*. In addition, such
15 vectors direct either the secretion or intracellular retention of expressed proteins and enable integration of foreign sequences into the host genome for stable propagation. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra; Bitter, G.A. et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; and Scorer, C.A. et al. (1994) *Bio/Technology* 12:181-184.)

Plant systems may also be used for expression of XMES. Transcription of sequences encoding
20 XMES may be driven by viral promoters, e.g., the 35S and 19S promoters of CaMV used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used. (See, e.g., Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.) These constructs can
25 be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. (See, e.g., The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196.)

In mammalian cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding XMES may be ligated into an
30 adenovirus transcription/translation complex consisting of the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome may be used to obtain infective virus which expresses XMES in host cells. (See, e.g., Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655-3659.) In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, may be used to increase expression in mammalian host cells. SV40 or EBV-

WO 01/94587

PCT/US01/18476

based vectors may also be used for high-level protein expression.

Human artificial chromosomes (HACs) may also be employed to deliver larger fragments of DNA than can be contained in and expressed from a plasmid. HACs of about 6 kb to 10 Mb are constructed and delivered via conventional delivery methods (liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles) for therapeutic purposes. (See, e.g., Harrington, J.J. et al. (1997) *Nat. Genet.* 15:345-355.)

For long term production of recombinant proteins in mammalian systems, stable expression of XMES in cell lines is preferred. For example, sequences encoding XMES can be transformed into cell lines using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for about 1 to 2 days in enriched media before being switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk⁻* and *ap^r* cells, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-232; Lowy, I. et al. (1980) *Cell* 22:817-823.) Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate; *neo* confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418; and *als* and *pat* confer resistance to chloresulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14.) Additional selectable genes have been described, e.g., *trpB* and *hisD*, which alter cellular requirements for metabolites. (See, e.g., Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8047-8051.) Visible markers, e.g., anthocyanins, green fluorescent proteins (GFP; Clontech), β glucuronidase and its substrate β -glucuronide, or luciferase and its substrate luciferin may be used. These markers can be used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system. (See, e.g., Rhodes, C.A. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131.)

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, the presence and expression of the gene may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding XMES is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences encoding XMES can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding XMES under the control of a single

WO 01/94587

PCT/US01/18476

promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the tandem gene as well.

In general, host cells that contain the nucleic acid sequence encoding XMES and that express XMES may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations, PCR amplification, and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein sequences.

Immunological methods for detecting and measuring the expression of XMES using either specific polyclonal or monoclonal antibodies are known in the art. Examples of such techniques include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on XMES is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are well known in the art. (See, e.g., Hampton, R. et al. (1990) *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St. Paul MN, Sect. IV; Coligan, J.E. et al. (1997) *Current Protocols in Immunology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY; and Pound, J.D. (1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ.)

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding XMES include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding XMES, or any fragments thereof, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6 and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits, such as those provided by Amersham Pharmacia Biotech, Promega (Madison WI), and US Biochemical. Suitable reporter molecules or labels which may be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding XMES may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a transformed cell may be secreted or retained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode XMES may be designed to contain signal sequences which direct secretion of XMES through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

In addition, a host cell strain may be chosen for its ability to modulate expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" or "pro" form of the protein may also be used to specify protein targeting, folding, and/or activity. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and WI38) are available from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas VA) and may be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

In another embodiment of the invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences encoding XMES may be ligated to a heterologous sequence resulting in translation of a fusion protein in any of the aforementioned host systems. For example, a chimeric XMES protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of XMES activity. Heterologous protein and peptide moieties may also facilitate purification of fusion proteins using commercially available affinity matrices. Such moieties include, but are not limited to, glutathione S-transferase (GST), maltose binding protein (MBP), thioredoxin (Trx), calmodulin binding peptide (CBP), 6-His, FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA). GST, MBP, Trx, CBP, and 6-His enable purification of their cognate fusion proteins on immobilized glutathione, maltose, phenylarsine oxide, calmodulin, and metal-chelate resins, respectively. FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA) enable immunoaffinity purification of fusion proteins using commercially available monoclonal and polyclonal antibodies that specifically recognize these epitope tags. A fusion protein may also be engineered to contain a proteolytic cleavage site located between the XMES encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that XMES may be cleaved away from the heterologous moiety following purification. Methods for fusion protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, *supra*, ch. 10). A variety of commercially available kits may also be used to facilitate expression and purification of fusion proteins.

In a further embodiment of the invention, synthesis of radiolabeled XMES may be achieved *in vitro* using the TNT rabbit reticulocyte lysate or wheat germ extract system (Promega). These systems couple transcription and translation of protein-coding sequences operably associated with the T7, T3, or SP6 promoters. Translation takes place in the presence of a radiolabeled amino acid precursor, for example, ³⁵S-methionine.

XMES of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to XMES. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for specific binding to XMES. Examples of test compounds include antibodies, oligonucleotides,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

proteins (e.g., receptors), or small molecules.

In one embodiment, the compound thus identified is closely related to the natural ligand of XMES, e.g., a ligand or fragment thereof, a natural substrate, a structural or functional mimetic, or a natural binding partner. (See, e.g., Coligan, J.E. et al. (1991) Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5.) Similarly, the compound can be closely related to the natural receptor to which XMES binds, or to at least a fragment of the receptor, e.g., the ligand binding site. In either case, the compound can be rationally designed using known techniques. In one embodiment, screening for these compounds involves producing appropriate cells which express XMES, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli. Cells expressing XMES or cell membrane fractions which contain XMES are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either XMES or the compound is analyzed.

An assay may simply test binding of a test compound to the polypeptide, wherein binding is detected by a fluorophore, radioisotope, enzyme conjugate, or other detectable label. For example, the assay may comprise the steps of combining at least one test compound with XMES, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of XMES to the compound. Alternatively, the assay may detect or measure binding of a test compound in the presence of a labeled competitor. Additionally, the assay may be carried out using cell-free preparations, chemical libraries, or natural product mixtures, and the test compound(s) may be free in solution or affixed to a solid support.

XMES of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that modulate the activity of XMES. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for XMES activity, wherein XMES is combined with at least one test compound, and the activity of XMES in the presence of a test compound is compared with the activity of XMES in the absence of the test compound. A change in the activity of XMES in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of XMES. Alternatively, a test compound is combined with an in vitro or cell-free system comprising XMES under conditions suitable for XMES activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of XMES may do so indirectly and need not come in direct contact with the test compound. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened.

In another embodiment, polynucleotides encoding XMES or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of

WO 01/94587

PCT/US01/18476

human disease. (See, e.g., U.S. Patent Number 5,175,383 and U.S. Patent Number 5,767,337.) For example, mouse ES cells, such as the mouse 129/SvJ cell line, are derived from the early mouse embryo and grown in culture. The ES cells are transformed with a vector containing the gene of interest disrupted by a marker gene, e.g., the neomycin phosphotransferase gene (neo; Capecchi, M.R. (1989) Science 244:1288-1292). The vector integrates into the corresponding region of the host genome by homologous recombination. Alternatively, homologous recombination takes place using the Cre-loxP system to knockout a gene of interest in a tissue- or developmental stage-specific manner (Marth, J.D. (1996) Clin. Invest. 97:1999-2002; Wagner, K.U. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:4323-4330). Transformed ES cells are identified and microinjected into mouse cell blastocysts such as those from the C57BL/6 mouse strain. The blastocysts are surgically transferred to pseudopregnant dams, and the resulting chimeric progeny are genotyped and bred to produce heterozygous or homozygous strains. Transgenic animals thus generated may be tested with potential therapeutic or toxic agents.

Polynucleotides encoding XMES may also be manipulated *in vitro* in ES cells derived from human blastocysts. Human ES cells have the potential to differentiate into at least eight separate cell lineages including endoderm, mesoderm, and ectodermal cell types. These cell lineages differentiate into, for example, neural cells, hematopoietic lineages, and cardiomyocytes (Thomson, J.A. et al. (1998) Science 282:1145-1147).

Polynucleotides encoding XMES can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs) or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region of a polynucleotide encoding XMES is injected into animal ES cells, and the injected sequence integrates into the animal cell genome. Transformed cells are injected into blastulae, and the blastulae are implanted as described above. Transgenic progeny or inbred lines are studied and treated with potential pharmaceutical agents to obtain information on treatment of a human disease. Alternatively, a mammal inbred to overexpress XMES, e.g., by secreting XMES in its milk, may also serve as a convenient source of that protein (Janne, J. et al. (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4:55-74).

THERAPEUTICS

Chemical and structural similarity, e.g., in the context of sequences and motifs, exists between regions of XMES and extracellular messengers. In addition, the expression of XMES is closely associated with cartilage and neurological tissues and with tumor tissues from brain, breast, liver, and prostate. Therefore, XMES appears to play a role in neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, developmental disorders, endocrine disorders, and cell proliferative disorders including cancer. In the treatment of disorders associated with increased XMES expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of XMES. In the treatment of disorders associated with decreased XMES expression or activity, it is desirable to increase the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

expression or activity of XMES.

Therefore, in one embodiment, XMES or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of XMES. Examples of such disorders include, but are not limited to, a neurological disorder

5 such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial

10 thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebellar hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system including Down syndrome, cerebral

15 palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive

20 dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; an autoimmune/inflammatory disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune

25 polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hyper eosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or

30 pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a developmental disorder such as

WO 01/94587

PCT/US01/18476

renal tubular acidosis, anemia, Cushing's syndrome, achondroplastic dwarfism, Duchenne and Becker muscular dystrophy, epilepsy, gonadal dysgenesis, WAGR syndrome (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation), Smith-Magenis syndrome, myelodysplastic syndrome, hereditary mucopolysaccharidosis, hereditary keratodermas, hereditary neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease and neurofibromatosis, hypothyroidism, hydrocephalus, seizure disorders such as Sydenham's chorea and cerebral palsy, spina bifida, anencephaly, craniorachischisis, congenital glaucoma, cataract, and sensorineural hearing loss; an endocrine disorder such as a disorder of the hypothalamus and/or pituitary resulting from lesions such as a primary brain tumor, adenoma, infarction associated with pregnancy, hypophysectomy, aneurysm, vascular malformation, thrombosis, infection, immunological disorder, and complication due to head trauma; a disorder associated with hypopituitarism including hypogonadism, Sheehan syndrome, diabetes insipidus, Kallman's disease, Hand-Schuller-Christian disease, Letterer-Siwe disease, sarcoidosis, empty sella syndrome, and dwarfism; a disorder associated with hyperpituitarism including acromegaly, gigantism, and syndrome of inappropriate antidiuretic hormone (ADH) secretion (SIADH) often caused by benign adenoma; a disorder associated with hypothyroidism including goiter, myxedema, acute thyroiditis associated with bacterial infection, subacute thyroiditis associated with viral infection, autoimmune thyroiditis (Hashimoto's disease), and cretinism; a disorder associated with hyperthyroidism including thyrotoxicosis and its various forms, Grave's disease, pretibial myxedema, toxic multinodular goiter, thyroid carcinoma, and Plummer's disease; a disorder associated with hyperparathyroidism including Conn disease (chronic hypercalcemia); a pancreatic disorder such as Type I or Type II diabetes mellitus and associated complications; a disorder associated with the adrenals such as hyperplasia, carcinoma, or adenoma of the adrenal cortex, hypertension associated with alkalosis, amyloidosis, hypokalemia, Cushing's disease, Liddle's syndrome, and Arnold-Healy-Gordon syndrome, pheochromocytoma tumors, and Addison's disease; a disorder associated with gonadal steroid hormones such as: in women, abnormal prolactin production, infertility, endometriosis, perturbation of the menstrual cycle, polycystic ovarian disease, hyperprolactinemia, isolated gonadotropin deficiency, amenorrhea, galactorrhea, hermaphroditism, hirsutism and virilization, breast cancer, and, in post-menopausal women, osteoporosis; and, in men, Leydig cell deficiency, male climacteric phase, and germinal cell aplasia, a hypergonadal disorder associated with Leydig cell tumors, androgen resistance associated with absence of androgen receptors, 5 α -reductase deficiency, 21-hydroxylase deficiency, and gynecomastia, and a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus.

In another embodiment, a vector capable of expressing XMES or a fragment or derivative thereof may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of XMES including, but not limited to, those described above.

In a further embodiment, a composition comprising a substantially purified XMES in conjunction with a suitable pharmaceutical carrier may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of XMES including, but not limited to, those provided above.

In still another embodiment, an agonist which modulates the activity of XMES may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of XMES including, but not limited to, those listed above.

In a further embodiment, an antagonist of XMES may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of XMES. Examples of such disorders include, but are not limited to, those neurological disorders, autoimmune/inflammatory disorders, developmental disorders, endocrine disorders, and cell proliferative disorders including cancer described above. In one aspect, an antibody which specifically binds XMES may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissues which express XMES.

In an additional embodiment, a vector expressing the complement of the polynucleotide encoding XMES may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of XMES including, but not limited to, those described above.

In other embodiments, any of the proteins, antagonists, antibodies, agonists, complementary sequences, or vectors of the invention may be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy may be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents may act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

An antagonist of XMES may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified XMES may be used to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents to identify those which specifically bind XMES. Antibodies to XMES may also be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not

WO 01/94587

PCT/US01/18476

limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, and single chain antibodies, Fab fragments, and fragments produced by a Fab expression library. Neutralizing antibodies (i.e., those which inhibit dimer formation) are generally preferred for therapeutic use.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others may be immunized by injection with XMES or with any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Among adjuvants used in humans, BCG (bacilli Calmette-Guérin) and *Corynebacterium parvum* are especially preferable.

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to XMES have an amino acid sequence consisting of at least about 5 amino acids, and generally will consist of at least about 10 amino acids. It is also preferable that these oligopeptides, peptides, or fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of XMES amino acids may be fused with those of another protein, such as KLH, and antibodies to the chimeric molecule may be produced.

Monoclonal antibodies to XMES may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique. (See, e.g., Kohler, G. et al. (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, D. et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81:31-42; Cote, R.J. et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030; and Cole, S.P. et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62:109-120.)

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," such as the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity, can be used. (See, e.g., Morrison, S.L. et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Neuberger, M.S. et al. (1984) *Nature* 312:604-608; and Takeda, S. et al. (1985) *Nature* 314:452-454.) Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted, using methods known in the art, to produce XMES-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. (See, e.g., Burton, D.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10134-10137.)

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature. (See, e.g., Orlandi, R. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837; Winter,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)

Antibody fragments which contain specific binding sites for XMES may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, F(ab)₂ fragments produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab)₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity. (See, e.g., Huse, W.D. et al. (1989) Science 246:1275-1281.)

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between XMES and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering XMES epitopes is generally used, but a competitive binding assay may also be employed (Pound, *supra*).

Various methods such as Scatchard analysis in conjunction with radioimmunoassay techniques may be used to assess the affinity of antibodies for XMES. Affinity is expressed as an association constant, K_a , which is defined as the molar concentration of XMES-antibody complex divided by the molar concentrations of free antigen and free antibody under equilibrium conditions. The K_a determined for a preparation of polyclonal antibodies, which are heterogeneous in their affinities for multiple XMES epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for XMES. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular XMES epitope, represents a true measure of affinity. High-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^9 to 10^{12} L/mole are preferred for use in immunoassays in which the XMES-antibody complex must withstand rigorous manipulations. Low-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^6 to 10^7 L/mole are preferred for use in immunopurification and similar procedures which ultimately require dissociation of XMES, preferably in active form, from the antibody (Catty, D. (1988) *Antibodies, Volume I: A Practical Approach*, IRL Press, Washington DC; Liddell, J.E. and A. Cryer (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*, John Wiley & Sons, New York NY).

The titer and avidity of polyclonal antibody preparations may be further evaluated to determine the quality and suitability of such preparations for certain downstream applications. For example, a polyclonal antibody preparation containing at least 1-2 mg specific antibody/ml, preferably 5-10 mg specific antibody/ml, is generally employed in procedures requiring precipitation of XMES-antibody complexes. Procedures for evaluating antibody specificity, titer, and avidity, and guidelines for antibody quality and usage in various applications, are generally available. (See, e.g., Catty, *supra*, and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Coligan et al. *supra*.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding XMES, or any fragment or complement thereof, may be used for therapeutic purposes. In one aspect, modifications of gene expression can be achieved by designing complementary sequences or antisense molecules (DNA, RNA, PNA, or modified oligonucleotides) to the coding or regulatory regions of the gene encoding XMES. Such technology is well known in the art, and antisense oligonucleotides or larger fragments can be designed from various locations along the coding or control regions of sequences encoding XMES. (See, e.g., Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ.)

In therapeutic use, any gene delivery system suitable for introduction of the antisense sequences into appropriate target cells can be used. Antisense sequences can be delivered intracellularly in the form of an expression plasmid which, upon transcription, produces a sequence complementary to at least a portion of the cellular sequence encoding the target protein. (See, e.g., Slater, J.E. et al. (1998) *J. Allergy Clin. Immunol.* 102(3):469-475; and Scanlon, K.J. et al. (1995) 9(13):1288-1296.) Antisense sequences can also be introduced intracellularly through the use of viral vectors, such as retrovirus and adeno-associated virus vectors. (See, e.g., Miller, A.D. (1990) *Blood* 76:271; Ausubel, *supra*; Uckert, W. and W. Walther (1994) *Pharmacol. Ther.* 63(3):323-347.) Other gene delivery mechanisms include liposome-derived systems, artificial viral envelopes, and other systems known in the art. (See, e.g., Rossi, J.J. (1995) *Br. Med. Bull.* 51(1):217-225; Boado, R.J. et al. (1998) *J. Pharm. Sci.* 87(11):1308-1315; and Morris, M.C. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(14):2730-2736.)

In another embodiment of the invention, polynucleotides encoding XMES may be used for somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency (e.g., in the cases of severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease characterized by X-linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) *Science* 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaese, R.M. et al. (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. et al. (1995) *Science* 270:470-475), cystic fibrosis (Zabner, J. et al. (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703), thalassemias, familial hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)), (ii) express a conditionally lethal gene product (e.g., in the case of cancers which result from unregulated cell proliferation), or (iii) express a protein which affords protection against intracellular parasites (e.g., against human retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396; Poeschla, E. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399),

WO 01/94587

PCT/US01/18476

hepatitis B or C virus (HBV, HCV); fungal parasites, such as Candida albicans and Paracoccidioides brasiliensis; and protozoan parasites such as Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi). In the case where a genetic deficiency in XMES expression or regulation causes disease, the expression of XMES from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations caused by the genetic deficiency.

In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in XMES are treated by constructing mammalian expression vectors encoding XMES and introducing these vectors by mechanical means into XMES-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells *in vivo* or *ex vivo* include (i) direct DNA microinjection into individual cells, (ii) ballistic gold particle delivery, (iii) liposome-mediated transfection, (iv) receptor-mediated gene transfer, and (v) the use of DNA transposons (Morgan, R.A. and W.F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62:191-217; Ivics, Z. (1997) *Cell* 91:501-510; Boulay, J.-L. and H. Récipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:445-450).

Expression vectors that may be effective for the expression of XMES include, but are not limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX vectors (Invitrogen, Carlsbad CA), PCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). XMES may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), SV40 virus, thymidine kinase (TK), or β -actin genes), (ii) an inducible promoter (e.g., the tetracycline-regulated promoter (Gossen, M. and H. Bujard (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) *Science* 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456), commercially available in the T-REX plasmid (Invitrogen)); the ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and Blau, H.M. *supra*)), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding XMES from a normal individual.

Commercially available liposome transformation kits (e.g., the PERFECT LIPID TRANSFECTION KIT, available from Invitrogen) allow one with ordinary skill in the art to deliver polynucleotides to target cells in culture and require minimal effort to optimize experimental parameters. In the alternative, transformation is performed using the calcium phosphate method (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) *Virology* 52:456-467), or by electroporation (Neumann, E. et al. (1982) *EMBO J.* 1:841-845). The introduction of DNA to primary cells requires modification of these standardized mammalian transfection protocols.

In another embodiment of the invention, diseases or disorders caused by genetic defects with

WO 01/94587

PCT/US01/18476

- respect to XMES expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding XMES under the control of an independent promoter or the retrovirus long terminal repeat (LTR) promoter, (ii) appropriate RNA packaging signals, and (iii) a Rev-responsive element (RRE) along with additional retrovirus *cis*-acting RNA sequences and coding sequences
- 5 required for efficient vector propagation. Retrovirus vectors (e.g., PFB and PFBNEO) are commercially available (Stratagene) and are based on published data (Riviere, I. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737), incorporated by reference herein. The vector is propagated in an appropriate vector producing cell line (VPCL) that expresses an envelope gene with a tropism for receptors on the target cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent Number 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses a method for obtaining retrovirus packaging cell lines and is hereby incorporated by reference.
- 15 Propagation of retrovirus vectors, transduction of a population of cells (e.g., CD4⁺ T-cells), and the return of transduced cells to a patient are procedures well known to persons skilled in the art of gene therapy and have been well documented (Ranga, U. et al. (1997) J. Virol. 71:7020-7029; Bauer, G. et al. (1997) Blood 89:2259-2267; Bonyhadi, M.L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716; Ranga, U. et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1201-1206; Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290).
- 20 In the alternative, an adenovirus-based gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding XMES to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of XMES. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Csete, M.E. et al. (1995) Transplantation 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent Number 5,707,618 to Armentano ("Adenovirus vectors for gene therapy"), hereby incorporated by reference. For adenoviral vectors, see also Antinuzzi, P.A. et al. (1999) Annu. Rev. Nutr. 19:511-544 and Verma, I.M. and N. Somia (1997) Nature 389:239-242, both incorporated by reference herein.
- 30 In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding XMES to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of XMES. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing XMES to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with

WO 01/94587

PCT/US01/18476

ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) *Exp. Eye Res.* 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent Number 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent Number 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV d92 which consists of a genome containing at least one exogenous gene to be transferred to a cell under the control of the appropriate promoter for purposes including human gene therapy. Also taught by this patent are the construction and use of recombinant HSV strains deleted for ICP4, ICP27 and ICP22. For HSV vectors, see also Goins, W.F. et al. (1999) *J. Virol.* 73:519-532 and Xu, H. et al. (1994) *Dev. Biol.* 163:152-161, hereby incorporated by reference. The manipulation of cloned herpesvirus sequences, the generation of recombinant virus following the transfection of multiple plasmids containing different segments of the large herpesvirus genomes, the growth and propagation of herpesvirus, and the infection of cells with herpesvirus are techniques well known to those of ordinary skill in the art.

In another alternative, an alphavirus (positive, single-stranded RNA virus) vector is used to deliver polynucleotides encoding XMES to target cells. The biology of the prototypic alphavirus, Semliki Forest Virus (SFV), has been studied extensively and gene transfer vectors have been based on the SFV genome (Garoff, H. and K.-J. Li (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:464-469). During alphavirus RNA replication, a subgenomic RNA is generated that normally encodes the viral capsid proteins. This subgenomic RNA replicates to higher levels than the full length genomic RNA, resulting in the overproduction of capsid proteins relative to the viral proteins with enzymatic activity (e.g., protease and polymerase). Similarly, inserting the coding sequence for XMES into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of XMES-coding RNAs and the synthesis of high levels of XMES in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a persistent infection in hamster normal kidney cells (BHK-21) with a variant of Sindbis virus (SIN) indicates that the lytic replication of alphaviruses can be altered to suit the needs of the gene therapy application (Dryga, S.A. et al. (1997) *Virology* 228:74-83). The wide host range of alphaviruses will allow the introduction of XMES into a variety of cell types. The specific transduction of a subset of cells in a population may require the sorting of cells prior to transduction. The methods of manipulating infectious cDNA clones of alphaviruses, performing alphavirus cDNA and RNA transfections, and performing alphavirus infections, are well known to those with ordinary skill in the art.

Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between about positions -10 and +10 from the start site, may also be employed to inhibit gene expression. Similarly, inhibition can

WO 01/94587

PCT/US01/18476

be achieved using triple helix base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature. (See, e.g., Gee, J.E. et al. (1994) in Huber, B.E. and B.I. Carr, 5 Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing, Mt. Kisco NY, pp. 163-177.) A complementary sequence or antisense molecule may also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Ribozymes, enzymatic RNA molecules, may also be used to catalyze the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme 10 molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. For example, engineered hammerhead motif ribozyme molecules may specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding XMES.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites, including the following sequences: GUA, 15 GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides, corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site, may be evaluated for secondary structural features which may render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets may also be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

20 Complementary ribonucleic acid molecules and ribozymes of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of nucleic acid molecules. These include techniques for chemically synthesizing oligonucleotides such as solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding XMES. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with 25 suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, these cDNA constructs that synthesize complementary RNA, constitutively or inducibly, can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

RNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible 30 modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends of the molecule, or the use of phosphorothioate or 2' O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the backbone of the molecule. This concept is inherent in the production of PNAs and can be extended in all of these molecules by the inclusion of nontraditional bases such as inosine, queosine, and wybutosine, as well as acetyl-, methyl-, thio-, and similarly modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine, and uridine which are not as easily recognized by endogenous endonucleases.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

An additional embodiment of the invention encompasses a method for screening for a compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding XMES. Compounds which may be effective in altering expression of a specific polynucleotide may include, but are not limited to, oligonucleotides, antisense oligonucleotides, triple helix-forming oligonucleotides, transcription factors and other polypeptide transcriptional regulators, and non-macromolecular chemical entities which are capable of interacting with specific polynucleotide sequences. Effective compounds may alter polynucleotide expression by acting as either inhibitors or promoters of polynucleotide expression. Thus, in the treatment of disorders associated with increased XMES expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding XMES may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased XMES expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding XMES may be therapeutically useful.

At least one, and up to a plurality, of test compounds may be screened for effectiveness in altering expression of a specific polynucleotide. A test compound may be obtained by any method commonly known in the art, including chemical modification of a compound known to be effective in altering polynucleotide expression; selection from an existing, commercially-available or proprietary library of naturally-occurring or non-natural chemical compounds; rational design of a compound based on chemical and/or structural properties of the target polynucleotide; and selection from a library of chemical compounds created combinatorially or randomly. A sample comprising a polynucleotide encoding XMES is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample may comprise, for example, an intact or permeabilized cell, or an *in vitro* cell-free or reconstituted biochemical system. Alterations in the expression of a polynucleotide encoding XMES are assayed by any method commonly known in the art. Typically, the expression of a specific nucleotide is detected by hybridization with a probe having a nucleotide sequence complementary to the sequence of the polynucleotide encoding XMES. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a *Schizosaccharomyces pombe* gene expression system (Atkins, D. et al. (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide

WO 01/94587

PCT/US01/18476

sequence (Bruce, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruce, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors may be introduced into stem cells taken
5 from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient.

Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (See, e.g., Goldman, C.K. et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.)

Any of the therapeutic methods described above may be applied to any subject in need of such
10 therapy, including, for example, mammals such as humans, dogs, cats, cows, horses, rabbits, and monkeys.

An additional embodiment of the invention relates to the administration of a composition which generally comprises an active ingredient formulated with a pharmaceutically acceptable excipient.

Excipients may include, for example, sugars, starches, celluloses, gums, and proteins. Various
15 formulations are commonly known and are thoroughly discussed in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA). Such compositions may consist of XMES, antibodies to XMES, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of XMES.

The compositions utilized in this invention may be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal,
20 intraventricular, pulmonary, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, or rectal means.

Compositions for pulmonary administration may be prepared in liquid or dry powder form.

These compositions are generally aerosolized immediately prior to inhalation by the patient. In the case of small molecules (e.g. traditional low molecular weight organic drugs), aerosol delivery of fast-acting
25 formulations is well-known in the art. In the case of macromolecules (e.g. larger peptides and proteins), recent developments in the field of pulmonary delivery via the alveolar region of the lung have enabled the practical delivery of drugs such as insulin to blood circulation (see, e.g., Patton, J.S. et al., U.S. Patent No. 5,997,848). Pulmonary delivery has the advantage of administration without needle injection, and obviates the need for potentially toxic penetration enhancers.

30 Compositions suitable for use in the invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an effective dose is well within the capability of those skilled in the art.

Specialized forms of compositions may be prepared for direct intracellular delivery of macromolecules comprising XMES or fragments thereof. For example, liposome preparations

WO 01/94587

PCT/US01/18476

containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of the macromolecule. Alternatively, XMES or a fragment thereof may be joined to a short cationic N-terminal portion from the HIV Tat-1 protein. Fusion proteins thus generated have been found to transduce into the cells of all tissues, including the brain, in a mouse model system (Schwarze, S.R. et al. (1999) *Science* 285:1569-1572).

5 For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., of neoplastic cells, or in animal models such as mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, or pigs. An animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

10 A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example XMES or fragments thereof, antibodies of XMES, and agonists, antagonists or inhibitors of XMES, which ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental animals, such as by calculating the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD₅₀/ED₅₀ ratio. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used to formulate a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration.

20 The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject requiring treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active moiety or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

30 Normal dosage amounts may vary from about 0.1 μ g to 100,000 μ g, up to a total dose of about 1 gram, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

conditions, locations, etc.

DIAGNOSTICS

In another embodiment, antibodies which specifically bind XMES may be used for the diagnosis of disorders characterized by expression of XMES, or in assays to monitor patients being treated with XMES or agonists, antagonists, or inhibitors of XMES. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic assays for XMES include methods which utilize the antibody and a label to detect XMES in human body fluids or in extracts of cells or tissues. The antibodies may be used with or without modification, and may be labeled by covalent or non-covalent attachment of a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules, several of which are described above, are known in the art and may be used.

A variety of protocols for measuring XMES, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of XMES expression. Normal or standard values for XMES expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibodies to XMES under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of XMES expressed in subject, control, and disease samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding XMES may be used for diagnostic purposes. The polynucleotides which may be used include oligonucleotide sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect and quantify gene expression in biopsied tissues in which expression of XMES may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of XMES, and to monitor regulation of XMES levels during therapeutic intervention.

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding XMES or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode XMES. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., the 5' regulatory region, or from a less specific region, e.g., a conserved motif, and the stringency of the hybridization or amplification will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding XMES, allelic variants, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of related sequences, and may have at least 50% sequence identity to any of the XMES encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:10-18 or from

WO 01/94587

PCT/US01/18476

genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the XMES gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding XMES include the cloning of polynucleotide sequences encoding XMES or XMES derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may
5 be used to synthesize RNA probes *in vitro* by means of the addition of the appropriate RNA polymerases and the appropriate labeled nucleotides. Hybridization probes may be labeled by a variety of reporter groups, for example, by radionuclides such as ³²P or ³⁵S, or by enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding XMES may be used for the diagnosis of disorders
10 associated with expression of XMES. Examples of such disorders include, but are not limited to, a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other
15 demyelinating diseases, bacterial and viral meningitis, brain abscess, subdural empyema, epidural abscess, suppurative intracranial thrombophlebitis, myelitis and radiculitis, viral central nervous system disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal
20 syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system including Down syndrome, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety,
25 and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; an autoimmune/inflammatory disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis,
30 anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner

5 syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a developmental disorder such as renal tubular acidosis, anemia, Cushing's syndrome, achondroplastic dwarfism, Duchenne and Becker muscular dystrophy, epilepsy, gonadal dysgenesis, WAGR syndrome (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation), Smith-Magenis syndrome, myelodysplastic

10 syndrome, hereditary mucoepithelial dysplasia, hereditary keratodermas, hereditary neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease and neurofibromatosis, hypothyroidism, hydrocephalus, seizure disorders such as Sydenham's chorea and cerebral palsy, spina bifida, anencephaly, craniorachischisis, congenital glaucoma, cataract, and sensorineural hearing loss; an endocrine disorder such as a disorder of the hypothalamus and/or pituitary resulting from lesions such as a primary brain tumor, adenoma,

15 infarction associated with pregnancy, hypophysectomy, aneurysm, vascular malformation, thrombosis, infection, immunological disorder, and complication due to head trauma; a disorder associated with hypopituitarism including hypogonadism, Sheehan syndrome, diabetes insipidus, Kallman's disease, Hand-Schuller-Christian disease, Letterer-Siwe disease, sarcoidosis, empty sella syndrome, and dwarfism; a disorder associated with hyperpituitarism including acromegaly, gigantism, and syndrome of

20 inappropriate antidiuretic hormone (ADH) secretion (SIADH) often caused by benign adenoma; a disorder associated with hypothyroidism including goiter, myxedema, acute thyroiditis associated with bacterial infection, subacute thyroiditis associated with viral infection, autoimmune thyroiditis (Hashimoto's disease), and cretinism; a disorder associated with hyperthyroidism including thyrotoxicosis and its various forms, Grave's disease, pretibial myxedema, toxic multinodular goiter,

25 thyroid carcinoma, and Plummer's disease; a disorder associated with hyperparathyroidism including Conn disease (chronic hypercalcemia); a pancreatic disorder such as Type I or Type II diabetes mellitus and associated complications; a disorder associated with the adrenals such as hyperplasia, carcinoma, or adenoma of the adrenal cortex, hypertension associated with alkalosis, amyloidosis, hypokalemia, Cushing's disease, Liddle's syndrome, and Arnold-Healy-Gordon syndrome, pheochromocytoma

30 tumors, and Addison's disease; a disorder associated with gonadal steroid hormones such as: in women, abnormal prolactin production, infertility, endometriosis, perturbation of the menstrual cycle, polycystic ovarian disease, hyperprolactinemia, isolated gonadotropin deficiency, amenorrhea, galactorrhea, hermaphroditism, hirsutism and virilization, breast cancer, and, in post-menopausal women, osteoporosis; and, in men, Leydig cell deficiency, male climacteric phase, and germinal cell

WO 01/94587

PCT/US01/18476

aplasia, a hypergonadal disorder associated with Leydig cell tumors, androgen resistance associated with absence of androgen receptors, 5 α -reductase deficiency, 21-hydroxylase deficiency, and gynecomastia, and a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, 5 paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus.

10 The polynucleotide sequences encoding XMES may be used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; in dipstick, pin, and multiformat ELISA-like assays; and in microarrays utilizing fluids or tissues from patients to detect altered XMES expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding XMES may be useful in assays that 15 detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding XMES may be labeled by standard methods and added to a fluid or tissue sample from a patient under conditions suitable for the formation of hybridization complexes. After a suitable incubation period, the sample is washed and the signal is quantified and compared with a standard value. If the amount of signal in the patient sample is significantly altered in comparison to a control 20 sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding XMES in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis of a disorder associated with expression of XMES, 25 a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, encoding XMES, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with values from an experiment in which a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. 30 Standard values obtained in this manner may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for a disorder. Deviation from standard values is used to establish the presence of a disorder.

Once the presence of a disorder is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to determine if the level of expression in the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

patient begins to approximate that which is observed in the normal subject. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

5 With respect to cancer, the presence of an abnormal amount of transcript (either under- or overexpressed) in biopsied tissue from an individual may indicate a predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier thereby preventing the development or further progression of the cancer.

10 Additional diagnostic uses for oligonucleotides designed from the sequences encoding XMES may involve the use of PCR. These oligomers may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced *in vitro*. Oligomers will preferably contain a fragment of a polynucleotide encoding XMES, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding XMES, and will be employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition.

15 Oligomers may also be employed under less stringent conditions for detection or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding XMES may be used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are substitutions, insertions and deletions that are a frequent cause of inherited or acquired genetic disease in humans. Methods of SNP detection include, but are not limited to, single-stranded conformation polymorphism (SSCP) and fluorescent SSCP (fSSCP) methods. In SSCP, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding XMES are used to amplify DNA using the polymerase chain reaction (PCR). The DNA may be derived, for example, from diseased or normal tissue, biopsy samples, bodily fluids, and the like. SNPs in the DNA cause differences in the secondary and tertiary structures of PCR products in single-stranded form, and these differences are detectable using gel electrophoresis in non-denaturing gels. In fSSCP, the oligonucleotide primers are fluorescently labeled, which allows detection of the amplicons in high-throughput equipment such as DNA sequencing machines. Additionally, sequence database analysis methods, termed *in silico* SNP (isSNP), are capable of identifying polymorphisms by comparing the sequence of individual overlapping DNA fragments which assemble into a common consensus sequence. These computer-based methods filter out sequence variations due to laboratory preparation of DNA and sequencing errors using statistical models and automated analyses of DNA sequence chromatograms. In the alternative, SNPs may be detected and characterized by mass spectrometry using, for example, the high throughput MASSARRAY system (Sequenom, Inc., San Diego CA).

20
25
30

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Methods which may also be used to quantify the expression of XMES include radiolabeling or biotinylating nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and interpolating results from standard curves. (See, e.g., Melby, P.C. et al. (1993) *J. Immunol. Methods* 159:235-244; Duplaa, C. et al. (1993) *Anal. Biochem.* 212:229-236.) The speed of quantitation of multiple samples may be accelerated by running the assay in a high-throughput format where the oligomer or polynucleotide of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantitation.

In further embodiments, oligonucleotides or longer fragments derived from any of the polynucleotide sequences described herein may be used as elements on a microarray. The microarray can be used in transcript imaging techniques which monitor the relative expression levels of large numbers of genes simultaneously as described below. The microarray may also be used to identify genetic variants, mutations, and polymorphisms. This information may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disorder, to diagnose a disorder, to monitor progression/regression of disease as a function of gene expression, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents in the treatment of disease. In particular, this information may be used to develop a pharmacogenomic profile of a patient in order to select the most appropriate and effective treatment regimen for that patient. For example, therapeutic agents which are highly effective and display the fewest side effects may be selected for a patient based on his/her pharmacogenomic profile.

In another embodiment, XMES, fragments of XMES, or antibodies specific for XMES may be used as elements on a microarray. The microarray may be used to monitor or measure protein-protein interactions, drug-target interactions, and gene expression profiles, as described above.

A particular embodiment relates to the use of the polynucleotides of the present invention to generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent Number 5,840,484, expressly incorporated by reference herein.) Thus a transcript image may be generated by hybridizing the polynucleotides of the present invention or their complements to the totality of transcripts or reverse transcripts of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the hybridization takes place in high-throughput format, wherein the polynucleotides of the present invention or their complements comprise a subset of a plurality of elements on a microarray. The resultant transcript image would provide a profile of gene activity.

Transcript images may be generated using transcripts isolated from tissues, cell lines, biopsies, or other biological samples. The transcript image may thus reflect gene expression *in vivo*, as in the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

case of a tissue or biopsy sample, or *in vitro*, as in the case of a cell line.

Transcript images which profile the expression of the polynucleotides of the present invention may also be used in conjunction with *in vitro* model systems and preclinical evaluation of pharmaceuticals, as well as toxicological testing of industrial and naturally-occurring environmental compounds. All compounds induce characteristic gene expression patterns, frequently termed molecular fingerprints or toxicant signatures, which are indicative of mechanisms of action and toxicity (Nuwaysir, E.F. et al. (1999) *Mol. Carcinog.* 24:153-159; Steiner, S. and N.L. Anderson (2000) *Toxicol. Lett.* 112-113:467-471, expressly incorporated by reference herein). If a test compound has a signature similar to that of a compound with known toxicity, it is likely to share those toxic properties. These fingerprints or signatures are most useful and refined when they contain expression information from a large number of genes and gene families. Ideally, a genome-wide measurement of expression provides the highest quality signature. Even genes whose expression is not altered by any tested compounds are important as well, as the levels of expression of these genes are used to normalize the rest of the expression data. The normalization procedure is useful for comparison of expression data after treatment with different compounds. While the assignment of gene function to elements of a toxicant signature aids in interpretation of toxicity mechanisms, knowledge of gene function is not necessary for the statistical matching of signatures which leads to prediction of toxicity. (See, for example, Press Release 00-02 from the National Institute of Environmental Health Sciences, released February 29, 2000, available at <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm>.) Therefore, it is important and desirable in toxicological screening using toxicant signatures to include all expressed gene sequences.

In one embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound. Nucleic acids that are expressed in the treated biological sample are hybridized with one or more probes specific to the polynucleotides of the present invention, so that transcript levels corresponding to the polynucleotides of the present invention may be quantified. The transcript levels in the treated biological sample are compared with levels in an untreated biological sample. Differences in the transcript levels between the two samples are indicative of a toxic response caused by the test compound in the treated sample.

Another particular embodiment relates to the use of the polypeptide sequences of the present invention to analyze the proteome of a tissue or cell type. The term proteome refers to the global pattern of protein expression in a particular tissue or cell type. Each protein component of a proteome can be subjected individually to further analysis. Proteome expression patterns, or profiles, are analyzed by quantifying the number of expressed proteins and their relative abundance under given conditions and at a given time. A profile of a cell's proteome may thus be generated by separating and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

analyzing the polypeptides of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the separation is achieved using two-dimensional gel electrophoresis, in which proteins from a sample are separated by isoelectric focusing in the first dimension, and then according to molecular weight by sodium dodecyl sulfate slab gel electrophoresis in the second dimension (Steiner and Anderson, *supra*). The proteins are visualized in the gel as discrete and uniquely positioned spots, typically by staining the gel with an agent such as Coomassie Blue or silver or fluorescent stains. The optical density of each protein spot is generally proportional to the level of the protein in the sample. The optical densities of equivalently positioned protein spots from different samples, for example, from biological samples either treated or untreated with a test compound or therapeutic agent, are compared to identify any changes in protein spot density related to the treatment. The proteins in the spots are partially sequenced using, for example, standard methods employing chemical or enzymatic cleavage followed by mass spectrometry. The identity of the protein in a spot may be determined by comparing its partial sequence, preferably of at least 5 contiguous amino acid residues, to the polypeptide sequences of the present invention. In some cases, further sequence data may be obtained for definitive protein identification.

A proteomic profile may also be generated using antibodies specific for XMES to quantify the levels of XMES expression. In one embodiment, the antibodies are used as elements on a microarray, and protein expression levels are quantified by exposing the microarray to the sample and detecting the levels of protein bound to each array element (Lueking, A. et al. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Mendoze, L.G. et al. (1999) *Biotechniques* 27:778-788). Detection may be performed by a variety of methods known in the art, for example, by reacting the proteins in the sample with a thiol- or amino-reactive fluorescent compound and detecting the amount of fluorescence bound at each array element.

Toxicant signatures at the proteome level are also useful for toxicological screening, and should be analyzed in parallel with toxicant signatures at the transcript level. There is a poor correlation between transcript and protein abundances for some proteins in some tissues (Anderson, N.L. and J. Seilhamer (1997) *Electrophoresis* 18:533-537), so proteome toxicant signatures may be useful in the analysis of compounds which do not significantly affect the transcript image, but which alter the proteomic profile. In addition, the analysis of transcripts in body fluids is difficult, due to rapid degradation of mRNA, so proteomic profiling may be more reliable and informative in such cases.

In another embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing proteins with the test compound. Proteins that are expressed in the treated biological sample are separated so that the amount of each protein can be quantified. The amount of each protein is compared to the amount of the corresponding protein in an untreated biological sample. A difference in the amount of protein between the two samples is indicative of a toxic response to the test compound in the treated sample. Individual proteins are identified by sequencing the amino acid residues of the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

individual proteins and comparing these partial sequences to the polypeptides of the present invention.

In another embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing proteins with the test compound. Proteins from the biological sample are incubated with antibodies specific to the polypeptides of the present invention. The amount of protein recognized by the antibodies is quantified. The amount of protein in the treated biological sample is compared with the amount in an untreated biological sample. A difference in the amount of protein between the two samples is indicative of a toxic response to the test compound in the treated sample.

Microarrays may be prepared, used, and analyzed using methods known in the art. (See, e.g., Brenman, T.M. et al. (1995) U.S. Patent No. 5,474,796; Schena, M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619; Baldeschweiler et al. (1995) PCT application WO95/251116; Shalon, D. et al. (1995) PCT application WO95/35505; Heller, R.A. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155; and Heller, M.J. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,605,662.) Various types of microarrays are well known and thoroughly described in DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, ed. (1999) Oxford University Press, London, hereby expressly incorporated by reference.

In another embodiment of the invention, nucleic acid sequences encoding XMES may be used to generate hybridization probes useful in mapping the naturally occurring genomic sequence. Either coding or noncoding sequences may be used, and in some instances, noncoding sequences may be preferable over coding sequences. For example, conservation of a coding sequence among members of a multi-gene family may potentially cause undesired cross hybridization during chromosomal mapping. The sequences may be mapped to a particular chromosome, to a specific region of a chromosome, or to artificial chromosome constructions, e.g., human artificial chromosomes (HACs), yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial P1 constructions, or single chromosome cDNA libraries. (See, e.g., Harrington, J.J. et al. (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C.M. (1993) Blood Rev. 7:127-134; and Trask, B.J. (1991) Trends Genet. 7:149-154.) Once mapped, the nucleic acid sequences of the invention may be used to develop genetic linkage maps, for example, which correlate the inheritance of a disease state with the inheritance of a particular chromosome region or restriction fragment length polymorphism (RFLP). (See, for example, Lander, E.S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357.)

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) may be correlated with other physical and genetic map data. (See, e.g., Heinz-Ulrich, et al. (1995) in Meyers, *supra*, pp. 965-968.) Examples of genetic map data can be found in various scientific journals or at the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) World Wide Web site. Correlation between the location of the gene encoding XMES on a physical map and a specific disorder, or a predisposition to a specific disorder, may help define the region of DNA associated with that disorder and thus may further positional cloning efforts.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

In situ hybridization of chromosomal preparations and physical mapping techniques, such as linkage analysis using established chromosomal markers, may be used for extending genetic maps. Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species, such as mouse, may reveal associated markers even if the exact chromosomal locus is not known. This information is
5 valuable to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once the gene or genes responsible for a disease or syndrome have been crudely localized by genetic linkage to a particular genomic region, e.g., ataxia-telangiectasia to 11q22-23, any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. (See, e.g., Gatti, R.A. et al. (1988) Nature 336:577-580.) The nucleotide sequence of the instant invention may
10 also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc., among normal, carrier, or affected individuals.

In another embodiment of the invention, XMES, its catalytic or immunogenic fragments, or oligopeptides thereof can be used for screening libraries of compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such screening may be free in solution, affixed to a
15 solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The formation of binding complexes between XMES and the agent being tested may be measured.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest. (See, e.g., Geysen, et al. (1984) PCT application WO84/03564.) In this method, large numbers of different small test compounds are
20 synthesized on a solid substrate. The test compounds are reacted with XMES, or fragments thereof, and washed. Bound XMES is then detected by methods well known in the art. Purified XMES can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on a solid support.

In another embodiment, one may use competitive drug screening assays in which neutralizing
25 antibodies capable of binding XMES specifically compete with a test compound for binding XMES. In this manner, antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with XMES.

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode XMES may be used in any
30 molecular biology techniques that have yet to be developed, provided the new techniques rely on properties of nucleotide sequences that are currently known, including, but not limited to, such properties as the triplet genetic code and specific base pair interactions.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following embodiments are,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

The disclosures of all patents, applications and publications, mentioned above and below, including U.S. Ser. No. 60/210,233, U.S. Ser. No. 60/213,465, and U.S. Ser. No. 60/249,019 are expressly incorporated by reference herein.

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA) and shown in Table 4, column 5. Some tissues were homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in a suitable mixture of denaturants, such as TRIZOL (Life Technologies), a monophasic solution of phenol and guanidine isothiocyanate. The resulting lysates were centrifuged over CsCl cushions or extracted with chloroform. RNA was precipitated from the lysates with either isopropanol or sodium acetate and ethanol, or by other routine methods.

Phenol extraction and precipitation of RNA were repeated as necessary to increase RNA purity. In some cases, RNA was treated with DNase. For most libraries, poly(A)⁺ RNA was isolated using oligo d(T)-coupled paramagnetic particles (Promega), OLIGOTEX latex particles (QIAGEN, Chatsworth CA), or an OLIGOTEX mRNA purification kit (QIAGEN). Alternatively, RNA was isolated directly from tissue lysates using other RNA isolation kits, e.g., the POLY(A)PURE mRNA purification kit (Ambion, Austin TX).

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERSCRIPRT plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, *supra*, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column chromatography (Amersham Pharmacia Biotech) or preparative agarose gel electrophoresis. cDNAs were ligated into compatible restriction enzyme sites of the polylinker of a suitable plasmid, e.g., PBLUESCRIPRT plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), or pINCY (Incyte Genomics, Palo Alto CA), or derivatives thereof. Recombinant plasmids were transformed into competent *E. coli* cells

WO 01/94587

PCT/US01/18476

including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5 α , DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

II. Isolation of cDNA Clones

Plasmids obtained as described in Example I were recovered from host cells by *in vivo* excision using the UNIZAP vector system (Stratagene) or by cell lysis. Plasmids were purified using at least one of the following: a Magic or WIZARD Minipreps DNA purification system (Promega); an AGTC Miniprep purification kit (Edge Biosystems, Gaithersburg MD); and QIAWELL 8 Plasmid, QIAWELL 8 Plus Plasmid, QIAWELL 8 Ultra Plasmid purification systems or the R.E.A.L. PREP 96 plasmid purification kit from QIAGEN. Following precipitation, plasmids were resuspended in 0.1 ml of distilled water and stored, with or without lyophilization, at 4°C.

Alternatively, plasmid DNA was amplified from host cell lysates using direct link PCR in a high-throughput format (Rao, V.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14). Host cell lysis and thermal cycling steps were carried out in a single reaction mixture. Samples were processed and stored in 384-well plates, and the concentration of amplified plasmid DNA was quantified fluorometrically using PICOGREEN dye (Molecular Probes, Eugene OR) and a FLUOROSKAN II fluorescence scanner (Labsystems Oy, Helsinki, Finland).

III. Sequencing and Analysis

Incyte cDNA recovered in plasmids as described in Example II were sequenced as follows. Sequencing reactions were processed using standard methods or high-throughput instrumentation such as the ABI CATALYST 800 (Applied Biosystems) thermal cycler or the PTC-200 thermal cycler (MJ Research) in conjunction with the HYDRA microdispenser (Robbins Scientific) or the MICROLAB 2200 (Hamilton) liquid transfer system. cDNA sequencing reactions were prepared using reagents provided by Amersham Pharmacia Biotech or supplied in ABI sequencing kits such as the ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems). Electrophoretic separation of cDNA sequencing reactions and detection of labeled polynucleotides were carried out using the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics); the ABI PRISM 373 or 377 sequencing system (Applied Biosystems) in conjunction with standard ABI protocols and base calling software; or other sequence analysis systems known in the art. Reading frames within the cDNA sequences were identified using standard methods (reviewed in Ausubel, 1997, *supra*, unit 7.7). Some of the cDNA sequences were selected for extension using the techniques disclosed in Example VIII.

The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The Incyte cDNA

WO 01/94587

PCT/US01/18476

sequences or translations thereof were then queried against a selection of public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases, and BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic approach which analyzes consensus primary structures of gene families.

- 5 See, for example, Eddy, S.R. (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched sequences, stretched sequences, or Genscan-predicted coding sequences (see Examples IV and V) were used to extend Incyte cDNA assemblages to full length.
- 10 Assembly was performed using programs based on Phred, Phrap, and Consed, and cDNA assemblages were screened for open reading frames using programs based on GeneMark, BLAST, and FASTA. The full length polynucleotide sequences were translated to derive the corresponding full length polypeptide sequences. Alternatively, a polypeptide of the invention may begin at any of the methionine residues of the full length translated polypeptide. Full length polypeptide sequences were subsequently
- 15 analyzed by querying against databases such as the GenBank protein databases (genpept), SwissProt, BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, Prosite, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. Full length polynucleotide sequences are also analyzed using MACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) and LASERGENE software (DNASTAR). Polynucleotide and polypeptide sequence alignments are
- 20 generated using default parameters specified by the CLUSTAL algorithm as incorporated into the MEGALIGN multisequence alignment program (DNASTAR), which also calculates the percent identity between aligned sequences.

- Table 7 summarizes the tools, programs, and algorithms used for the analysis and assembly of Incyte cDNA and full length sequences and provides applicable descriptions, references, and threshold
- 25 parameters. The first column of Table 7 shows the tools, programs, and algorithms used, the second column provides brief descriptions thereof, the third column presents appropriate references, all of which are incorporated by reference herein in their entirety, and the fourth column presents, where applicable, the scores, probability values, and other parameters used to evaluate the strength of a match between two sequences (the higher the score or the lower the probability value, the greater the identity
- 30 between two sequences).

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:10-18. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies are described in Table 4, column 4.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative extracellular messengers were initially identified by running the Genscan gene identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpri and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94, and Burge, C. and S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354). The program concatenates predicted exons to form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of Genscan is a FASTA database of polynucleotide and polypeptide sequences. The maximum range of sequence for Genscan to analyze at once was set to 30 kb. To determine which of these Genscan predicted cDNA sequences encode extracellular messengers, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for extracellular messengers. Potential extracellular messengers were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as extracellular messengers. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbpri public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from genpept to correct errors in the sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived entirely from edited or unedited Genscan-predicted coding sequences.

V. Assembly of Genomic Sequence Data with cDNA Sequence Data**"Stitched" Sequences**

Partial cDNA sequences were extended with exons predicted by the Genscan gene identification program described in Example IV. Partial cDNAs assembled as described in Example III were mapped to genomic DNA and parsed into clusters containing related cDNAs and Genscan exon predictions from one or more genomic sequences. Each cluster was analyzed using an algorithm based on graph theory and dynamic programming to integrate cDNA and genomic information, generating possible splice variants that were subsequently confirmed, edited, or extended to create a full length sequence. Sequence intervals in which the entire length of the interval was present on more than one sequence in the cluster were identified, and intervals thus identified were considered to be equivalent by transitivity. For example, if an interval was present on a cDNA and two genomic sequences, then all three intervals were considered to be equivalent. This process allows unrelated but consecutive genomic sequences to

WO 01/94587

PCT/US01/18476

be brought together, bridged by cDNA sequence. Intervals thus identified were then "stitched" together by the stitching algorithm in the order that they appear along their parent sequences to generate the longest possible sequence, as well as sequence variants. Linkages between intervals which proceed along one type of parent sequence (cDNA to cDNA or genomic sequence to genomic sequence) were given preference over linkages which change parent type (cDNA to genomic sequence). The resultant stitched sequences were translated and compared by BLAST analysis to the genpept and gbpr public databases. Incorrect exons predicted by Genscan were corrected by comparison to the top BLAST hit from genpept. Sequences were further extended with additional cDNA sequences, or by inspection of genomic DNA, when necessary.

10 "Stretched" Sequences

Partial DNA sequences were extended to full length with an algorithm based on BLAST analysis. First, partial cDNAs assembled as described in Example III were queried against public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases using the BLAST program. The nearest GenBank protein homolog was then compared by BLAST analysis to either Incyte cDNA sequences or GenScan exon predicted sequences described in Example IV. A chimeric protein was generated by using the resultant high-scoring segment pairs (HSPs) to map the translated sequences onto the GenBank protein homolog. Insertions or deletions may occur in the chimeric protein with respect to the original GenBank protein homolog. The GenBank protein homolog, the chimeric protein, or both were used as probes to search for homologous genomic sequences from the public human genome databases. Partial DNA sequences were therefore "stretched" or extended by the addition of homologous genomic sequences. The resultant stretched sequences were examined to determine whether it contained a complete gene.

VI. Chromosomal Mapping of XMES Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:10-18 were compared with sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:10-18 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been previously mapped. Inclusion of a mapped sequence in a cluster resulted in the assignment of all sequences of that cluster, including its particular SEQ ID NO., to that map location.

Map locations are represented by ranges, or intervals, of human chromosomes. The map position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the chromosome's p-

WO 01/94587

PCT/US01/18476

arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances are based on genetic markers mapped by Généthon which provide boundaries for radiation hybrid markers whose sequences were included in each of the clusters. Human genome maps and other resources available to the public, such as the NCBI "GeneMap'99" World Wide Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>), can be employed to determine if previously identified disease genes map within or in proximity to the intervals indicated above.

In this manner, SEQ ID NO:16 was mapped to chromosome 2 within the interval from 190.80 to 197.60 centiMorgans.

VII. Analysis of Polynucleotide Expression

Northern analysis is a laboratory technique used to detect the presence of a transcript of a gene and involves the hybridization of a labeled nucleotide sequence to a membrane on which RNAs from a particular cell type or tissue have been bound. (See, e.g., Sambrook, *supra*, ch. 7; Ausubel (1995) *supra*, ch. 4 and 16.)

Analogous computer techniques applying BLAST were used to search for identical or related molecules in cDNA databases such as GenBank or LIFESEQ (Incyte Genomics). This analysis is much faster than multiple membrane-based hybridizations. In addition, the sensitivity of the computer search can be modified to determine whether any particular match is categorized as exact or similar.

The basis of the search is the product score, which is defined as:

$$\frac{\text{BLAST Score} \times \text{Percent Identity}}{5 \times \text{minimum}(\text{length}(\text{Seq. 1}), \text{length}(\text{Seq. 2}))}$$

The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. The product score is a normalized value between 0 and 100, and is calculated as follows: the BLAST score is multiplied by the percent nucleotide identity and the product is divided by (5 times the length of the shorter of the two sequences). The BLAST score is calculated by assigning a score of +5 for every base that matches in a high-scoring segment pair (HSP), and -4 for every mismatch. Two sequences may share more than one HSP (separated by gaps). If there is more than one HSP, then the pair with the highest BLAST score is used to calculate the product score. The product score represents a balance between fractional overlap and quality in a BLAST alignment. For example, a product score of 100 is produced only for 100% identity over the entire length of the shorter of the two sequences being compared. A product score of 70 is produced either by 100% identity and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

70% overlap at one end, or by 88% identity and 100% overlap at the other. A product score of 50 is produced either by 100% identity and 50% overlap at one end, or 79% identity and 100% overlap.

Alternatively, polynucleotide sequences encoding XMES are analyzed with respect to the tissue sources from which they were derived. For example, some full length sequences are assembled, at least
5 in part, with overlapping Incyte cDNA sequences (see Example III). Each cDNA sequence is derived from a cDNA library constructed from a human tissue. Each human tissue is classified into one of the following organ/tissue categories: cardiovascular system; connective tissue; digestive system; embryonic structures; endocrine system; exocrine glands; genitalia, female; genitalia, male; germ cells; hematologic and immune system; liver; musculoskeletal system; nervous system; pancreas; respiratory
10 system; sense organs; skin; stomatognathic system; unclassified/mixed; or urinary tract. The number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all categories. Similarly, each human tissue is classified into one of the following disease/condition categories: cancer, cell line, developmental, inflammation, neurological, trauma, cardiovascular, pooled, and other, and the number of libraries in each category is counted and divided by the total number of libraries across all
15 categories. The resulting percentages reflect the tissue- and disease-specific expression of cDNA encoding XMES. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of XMES Encoding Polynucleotides

Full length polynucleotide sequences were also produced by extension of an appropriate
20 fragment of the full length molecule using oligonucleotide primers designed from this fragment. One primer was synthesized to initiate 5' extension of the known fragment, and the other primer was synthesized to initiate 3' extension of the known fragment. The initial primers were designed using OLIGO 4.06 software (National Biosciences), or another appropriate program, to be about 22 to 30 nucleotides in length, to have a GC content of about 50% or more, and to anneal to the target sequence
25 at temperatures of about 68°C to about 72°C. Any stretch of nucleotides which would result in hairpin structures and primer-primer dimerizations was avoided.

Selected human cDNA libraries were used to extend the sequence. If more than one extension was necessary or desired, additional or nested sets of primers were designed.

High fidelity amplification was obtained by PCR using methods well known in the art. PCR
30 was performed in 96-well plates using the PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Inc.). The reaction mix contained DNA template, 200 nmol of each primer, reaction buffer containing Mg²⁺, (NH₄)₂SO₄, and 2-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE enzyme (Life Technologies), and Pfu DNA polymerase (Stratagene), with the following parameters for primer pair PCI A and PCI B: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 68°C,

WO 01/94587

PCT/US01/18476

2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. In the alternative, the parameters for primer pair T7 and SK+ were as follows: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 57°C, 1 min; Step 4: 68°C, 2 min; Step 5: Steps 2, 3, and 4 repeated 20 times; Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C.

5 The concentration of DNA in each well was determined by dispensing 100 µl PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 µl of undiluted PCR product into each well of an opaque fluorimeter plate (Corning Costar, Acton MA), allowing the DNA to bind to the reagent. The plate was scanned in a Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 µl to 10 µl aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis
10 on a 1% agarose gel to determine which reactions were successful in extending the sequence.

The extended nucleotides were desalted and concentrated, transferred to 384-well plates, digested with CviJI cholera virus endonuclease (Molecular Biology Research, Madison WI), and sonicated or sheared prior to religation into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For
15 shotgun sequencing, the digested nucleotides were separated on low concentration (0.6 to 0.8%) agarose gels, fragments were excised, and agar digested with Agar ACE (Promega). Extended clones were religated using T4 ligase (New England Biolabs, Beverly MA) into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech), treated with Pfu DNA polymerase (Stratagene) to fill-in restriction site overhangs, and transfected into competent *E. coli* cells. Transformed cells were selected on antibiotic-containing
20 media, and individual colonies were picked and cultured overnight at 37°C in 384-well plates in LB/2x carb liquid media.

The cells were lysed, and DNA was amplified by PCR using Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech) and Pfu DNA polymerase (Stratagene) with the following parameters: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 72°C, 2 min; Step 5: steps 2, 3, and 4
25 repeated 29 times; Step 6: 72°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. DNA was quantified by PICOGREEN reagent (Molecular Probes) as described above. Samples with low DNA recoveries were reamplified using the same conditions as described above. Samples were diluted with 20% dimethylsulfoxide (1:2, v/v), and sequenced using DYENAMIC energy transfer sequencing primers and the DYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) or the ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle
30 sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems).

In like manner, full length polynucleotide sequences are verified using the above procedure or are used to obtain 5' regulatory sequences using the above procedure along with oligonucleotides designed for such extension, and an appropriate genomic library.

IX. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:10-18 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments.

Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μ Ci of [γ - 32 P] adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10^7 counts per minute of the labeled probe is used in a typical membrane-based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases: Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I, or Pvu II (DuPont NEN).

The DNA from each digest is fractionated on a 0.7% agarose gel and transferred to nylon membranes (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH). Hybridization is carried out for 16 hours at 40°C. To remove nonspecific signals, blots are sequentially washed at room temperature under conditions of up to, for example, 0.1 x saline sodium citrate and 0.5% sodium dodecyl sulfate. Hybridization patterns are visualized using autoradiography or an alternative imaging means and compared.

X. Microarrays

The linkage or synthesis of array elements upon a microarray can be achieved utilizing photolithography, piezoelectric printing (ink-jet printing. See, e.g., Baldeschweiler, *supra.*), mechanical microspotting technologies, and derivatives thereof. The substrate in each of the aforementioned technologies should be uniform and solid with a non-porous surface (Schna (1999), *supra.*). Suggested substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding procedures. A typical array may be produced using available methods and machines well known to those of ordinary skill in the art and may contain any appropriate number of elements. (See, e.g., Schna, M. et al. (1995) *Science* 270:467-470; Shalon, D. et al. (1996) *Genome Res.* 6:639-645; Marshall, A. and J. Hodgson (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:27-31.)

Full length cDNAs, Expressed Sequence Tags (ESTs), or fragments or oligomers thereof may comprise the elements of the microarray. Fragments or oligomers suitable for hybridization can be selected using software well known in the art such as LASERGENE software (DNASTAR). The array elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

After hybridization, nonhybridized nucleotides from the biological sample are removed, and a fluorescence scanner is used to detect hybridization at each array element. Alternatively, laser desorption and mass spectrometry may be used for detection of hybridization. The degree of complementarity and the relative abundance of each polynucleotide which hybridizes to an element on the microarray may be assessed. In one embodiment, microarray preparation and usage is described in detail below.

Tissue or Cell Sample Preparation

Total RNA is isolated from tissue samples using the guanidinium thiocyanate method and poly(A)⁺ RNA is purified using the oligo-(dT) cellulose method. Each poly(A)⁺ RNA sample is reverse transcribed using MMLV reverse-transcriptase, 0.05 pg/μl oligo-(dT) primer (21mer), 1X first strand buffer, 0.03 units/μl RNase inhibitor, 500 μM dATP, 500 μM dGTP, 500 μM dTTP, 40 μM dCTP, 40 μM dCTP-Cy3 (BDS) or dCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). The reverse transcription reaction is performed in a 25 ml volume containing 200 ng poly(A)⁺ RNA with GEMBRIGHT kits (Incyte). Specific control poly(A)⁺ RNAs are synthesized by *in vitro* transcription from non-coding yeast genomic DNA. After incubation at 37°C for 2 hr, each reaction sample (one with Cy3 and another with Cy5 labeling) is treated with 2.5 ml of 0.5M sodium hydroxide and incubated for 20 minutes at 85°C to stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified using two successive CHROMA SPIN 30 gel filtration spin columns (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) and after combining, both reaction samples are ethanol precipitated using 1 ml of glycogen (1 mg/ml), 60 ml sodium acetate, and 300 ml of 100% ethanol. The sample is then dried to completion using a SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) and resuspended in 14 μl 5X SSC/0.2% SDS.

Microarray Preparation

Sequences of the present invention are used to generate array elements. Each array element is amplified from bacterial cells containing vectors with cloned cDNA inserts. PCR amplification uses primers complementary to the vector sequences flanking the cDNA insert. Array elements are amplified in thirty cycles of PCR from an initial quantity of 1-2 ng to a final quantity greater than 5 μg. Amplified array elements are then purified using SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech).

Purified array elements are immobilized on polymer-coated glass slides. Glass microscope slides (Corning) are cleaned by ultrasound in 0.1% SDS and acetone, with extensive distilled water washes between and after treatments. Glass slides are etched in 4% hydrofluoric acid (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA), washed extensively in distilled water, and coated with 0.05% aminopropyl silane (Sigma) in 95% ethanol. Coated slides are cured in a 110°C oven.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in US Patent No. 5,807,522, incorporated herein by reference. 1 μ l of the array element DNA, at an average concentration of 100 ng/ μ l, is loaded into the open capillary printing element by a high-speed robotic apparatus. The apparatus then deposits about 5 nl of array element sample per slide.

5 Microarrays are UV-crosslinked using a STRATALINKER UV-crosslinker (Stratagene). Microarrays are washed at room temperature once in 0.2% SDS and three times in distilled water. Non-specific binding sites are blocked by incubation of microarrays in 0.2% casein in phosphate buffered saline (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) for 30 minutes at 60°C followed by washes in 0.2% SDS and distilled water as before.

10 **Hybridization**

Hybridization reactions contain 9 μ l of sample mixture consisting of 0.2 μ g each of Cy3 and Cy5 labeled cDNA synthesis products in 5X SSC, 0.2% SDS hybridization buffer. The sample mixture is heated to 65°C for 5 minutes and is aliquoted onto the microarray surface and covered with an 1.8 cm² coverslip. The arrays are transferred to a waterproof chamber having a cavity just slightly larger than a microscope slide. The chamber is kept at 100% humidity internally by the addition of 140 μ l of 5X SSC in a corner of the chamber. The chamber containing the arrays is incubated for about 6.5 hours at 60°C. The arrays are washed for 10 min at 45°C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45°C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

Detection

20 Reporter-labeled hybridization complexes are detected with a microscope equipped with an Innova 70 mixed gas 10 W laser (Coherent, Inc., Santa Clara CA) capable of generating spectral lines at 488 nm for excitation of Cy3 and at 632 nm for excitation of Cy5. The excitation laser light is focused on the array using a 20X microscope objective (Nikon, Inc., Melville NY). The slide containing the array is placed on a computer-controlled X-Y stage on the microscope and raster-scanned past the objective. The 1.8 cm x 1.8 cm array used in the present example is scanned with a resolution of 20 micrometers.

In two separate scans, a mixed gas multiline laser excites the two fluorophores sequentially. Emitted light is split, based on wavelength, into two photomultiplier tube detectors (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) corresponding to the two fluorophores. Appropriate filters positioned between the array and the photomultiplier tubes are used to filter the signals. The emission maxima of the fluorophores used are 565 nm for Cy3 and 650 nm for Cy5. Each array is typically scanned twice, one scan per fluorophore using the appropriate filters at the laser source, although the apparatus is capable of recording the spectra from both fluorophores simultaneously.

35 The sensitivity of the scans is typically calibrated using the signal intensity generated by a cDNA control species added to the sample mixture at a known concentration. A specific location on

WO 01/94587

PCT/US01/18476

the array contains a complementary DNA sequence, allowing the intensity of the signal at that location to be correlated with a weight ratio of hybridizing species of 1:100,000. When two samples from different sources (e.g., representing test and control cells), each labeled with a different fluorophore, are hybridized to a single array for the purpose of identifying genes that are differentially expressed, the calibration is done by labeling samples of the calibrating cDNA with the two fluorophores and adding identical amounts of each to the hybridization mixture.

The output of the photomultiplier tube is digitized using a 12-bit RTI-835H analog-to-digital (A/D) conversion board (Analog Devices, Inc., Norwood MA) installed in an IBM-compatible PC computer. The digitized data are displayed as an image where the signal intensity is mapped using a linear 20-color transformation to a pseudocolor scale ranging from blue (low signal) to red (high signal). The data is also analyzed quantitatively. Where two different fluorophores are excited and measured simultaneously, the data are first corrected for optical crosstalk (due to overlapping emission spectra) between the fluorophores using each fluorophore's emission spectrum.

A grid is superimposed over the fluorescence signal image such that the signal from each spot is centered in each element of the grid. The fluorescence signal within each element is then integrated to obtain a numerical value corresponding to the average intensity of the signal. The software used for signal analysis is the GEMTOOLS gene expression analysis program (Incyte).

XI. Complementary Polynucleotides

Sequences complementary to the XMES-encoding sequences, or any parts thereof, are used to detect, decrease, or inhibit expression of naturally occurring XMES. Although use of oligonucleotides comprising from about 15 to 30 base pairs is described, essentially the same procedure is used with smaller or with larger sequence fragments. Appropriate oligonucleotides are designed using OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and the coding sequence of XMES. To inhibit transcription, a complementary oligonucleotide is designed from the most unique 5' sequence and used to prevent promoter binding to the coding sequence. To inhibit translation, a complementary oligonucleotide is designed to prevent ribosomal binding to the XMES-encoding transcript.

XII. Expression of XMES

Expression and purification of XMES is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of XMES in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*tac*) hybrid promoter and the T5 or T7 bacteriophage promoter in conjunction with the *lac* operator regulatory element. Recombinant vectors are transformed into suitable bacterial hosts, e.g., BL21(DE3). Antibiotic resistant bacteria express XMES upon induction with isopropyl beta-D-

WO 01/94587

PCT/US01/18476

thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of XMES in eukaryotic cells is achieved by infecting insect or mammalian cell lines with recombinant *Autographica californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), commonly known as baculovirus. The nonessential polyhedrin gene of baculovirus is replaced with cDNA encoding XMES by either homologous recombination or bacterial-mediated transposition involving transfer plasmid intermediates. Viral infectivity is maintained and the strong polyhedrin promoter drives high levels of cDNA transcription. Recombinant baculovirus is used to infect *Spodoptera frugiperda* (SF9) insect cells in most cases, or human hepatocytes, in some cases. Infection of the latter requires additional genetic modifications to baculovirus. (See Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

In most expression systems, XMES is synthesized as a fusion protein with, e.g., glutathione S-transferase (GST) or a peptide epitope tag, such as FLAG or 6-His, permitting rapid, single-step, affinity-based purification of recombinant fusion protein from crude cell lysates. GST, a 26-kilodalton enzyme from *Schistosoma japonicum*, enables the purification of fusion proteins on immobilized glutathione under conditions that maintain protein activity and antigenicity (Amersham Pharmacia Biotech). Following purification, the GST moiety can be proteolytically cleaved from XMES at specifically engineered sites. FLAG, an 8-amino acid peptide, enables immunoaffinity purification using commercially available monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies (Eastman Kodak). 6-His, a stretch of six consecutive histidine residues, enables purification on metal-chelate resins (QIAGEN). Methods for protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, *supra*, ch. 10 and 16). Purified XMES obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI, and XVII where applicable.

XIII. Functional Assays

XMES function is assessed by expressing the sequences encoding XMES at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA), both of which contain the cytomegalovirus promoter. 5-10 μ g of recombinant vector are transiently transfected into a human cell line, for example, an endothelial or hematopoietic cell line, using either liposome formulations or electroporation. 1-2 μ g of an additional plasmid containing sequences encoding a marker protein are co-transfected. Expression of a marker protein provides a means to distinguish transfected cells from nontransfected cells and is a reliable predictor of cDNA expression from the recombinant vector. Marker proteins of choice include, e.g., Green Fluorescent Protein (GFP; Clontech), CD64, or a CD64-GFP fusion protein. Flow cytometry (FCM), an automated, laser optics-

WO 01/94587

PCT/US01/18476

based technique, is used to identify transfected cells expressing GFP or CD64-GFP and to evaluate the apoptotic state of the cells and other cellular properties. FCM detects and quantifies the uptake of fluorescent molecules that diagnose events preceding or coincident with cell death. These events include changes in nuclear DNA content as measured by staining of DNA with propidium iodide; changes in cell size and granularity as measured by forward light scatter and 90 degree side light scatter; down-regulation of DNA synthesis as measured by decrease in bromodeoxyuridine uptake; alterations in expression of cell surface and intracellular proteins as measured by reactivity with specific antibodies; and alterations in plasma membrane composition as measured by the binding of fluorescein-conjugated Annexin V protein to the cell surface. Methods in flow cytometry are discussed in Ormerod, M.G. (1994) Flow Cytometry, Oxford, New York NY.

The influence of XMES on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding XMES and either CD64 or CD64-GFP. CD64 and CD64-GFP are expressed on the surface of transfected cells and bind to conserved regions of human immunoglobulin G (IgG). Transfected cells are efficiently separated from nontransfected cells using magnetic beads coated with either human IgG or antibody against CD64 (DYNAL, Lake Success NY). mRNA can be purified from the cells using methods well known by those of skill in the art. Expression of mRNA encoding XMES and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

XIV. Production of XMES Specific Antibodies

XMES substantially purified using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; see, e.g., Harrington, M.G. (1990) Methods Enzymol. 182:488-495), or other purification techniques, is used to immunize rabbits and to produce antibodies using standard protocols.

Alternatively, the XMES amino acid sequence is analyzed using LASERGENE software (DNASTAR) to determine regions of high immunogenicity, and a corresponding oligopeptide is synthesized and used to raise antibodies by means known to those of skill in the art. Methods for selection of appropriate epitopes, such as those near the C-terminus or in hydrophilic regions are well described in the art. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra, ch. 11.)

Typically, oligopeptides of about 15 residues in length are synthesized using an ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems) using Fmoc chemistry and coupled to KLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) by reaction with N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) to increase immunogenicity. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra.) Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in complete Freund's adjuvant. Resulting antisera are tested for antipeptide and anti-XMES activity by, for example, binding the peptide or XMES to a substrate, blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radio-iodinated goat anti-rabbit IgG.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

XV. Purification of Naturally Occurring XMES Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant XMES is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for XMES. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-XMES antibody to an activated chromatographic resin, such as
5 CNBr-activated SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech). After the coupling, the resin is blocked and washed according to the manufacturer's instructions.

Media containing XMES are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of XMES (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt
10 antibody/XMES binding (e.g., a buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and XMES is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with XMES

XMES, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent. (See, e.g., Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539.) Candidate molecules
15 previously arrayed in the wells of a multi-well plate are incubated with the labeled XMES, washed, and any wells with labeled XMES complex are assayed. Data obtained using different concentrations of XMES are used to calculate values for the number, affinity, and association of XMES with the candidate molecules.

Alternatively, molecules interacting with XMES are analyzed using the yeast two-hybrid
20 system as described in Fields, S. and O. Song (1989) *Nature* 340:245-246, or using commercially available kits based on the two-hybrid system, such as the MATCHMAKER system (Clontech).

XMES may also be used in the PATHCALLING process (CuraGen Corp., New Haven CT) which employs the yeast two-hybrid system in a high-throughput manner to determine all interactions
between the proteins encoded by two large libraries of genes (Nandabalan, K. et al. (2000) U.S. Patent
25 No. 6,057,101).

XVII. Demonstration of XMES Activity

An assay for XMES-1 activity measures its inhibitory activity on Hepatocyte Growth Factor (HGF) activator. In this assay, HGF activator (450 ng/ml) is mixed with various concentrations of purified XMES-1 in PBS containing 0.05% CHAPS and incubated at 37 degrees C for 30 minutes to
30 form an enzyme-inhibitor complex. The remaining HGF-converting activity in the mixture is measured by the addition of equal amounts of single chain HGF (sc-HGF) (1.5 µg/ml in PBS containing 0.05% CHAPS) and dextran sulfate (100 mg/ml, MWCO=500,000, Sigma) followed by further incubation for 2 hours, and subsequent analysis by SDS-PAGE under reducing gel conditions. The gel is stained with coomassie blue and the amounts of sc-HGF and the heterodimeric form are measured by scanning the

WO 01/94587

PCT/US01/18476

stained bands. The inhibitory activity of XMES-1 against HGF activator is estimated by calculating the ratio of the remaining single chain form to total HGF (Shimomura, T. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:6370-6376).

An assay for XMES activity measures cell proliferation as the amount of newly initiated DNA synthesis in Swiss mouse 3T3 cells. A plasmid containing polynucleotides encoding XMES is transfected into quiescent 3T3 cultured cells using methods well known in the art. The transiently transfected cells are then incubated in the presence of [³H]thymidine, a radioactive DNA precursor. Where applicable, varying amounts of XMES ligand are added to the transfected cells. Incorporation of [³H]thymidine into acid-precipitable DNA is measured over an appropriate time interval, and the amount incorporated is directly proportional to the amount of newly synthesized DNA.

Various modifications and variations of the described methods and systems of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with certain embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
1657368	1	1657368CBI	10	1657368CBI
4028972	2	4028972CBI	11	4028972CBI
5398353	3	5398353CBI	12	5398353CBI
71234118	4	71234118CBI	13	71234118CBI
240168	5	240168CBI	14	240168CBI
7481107	6	7481107CBI	15	7481107CBI
7476245	7	7476245CBI	16	7476245CBI
5619744	8	5619744CBI	17	5619744CBI
5378619	9	5378619CBI	18	5378619CBI

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 2

Polypeptide Seq. ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability score	GenBank Homolog
1	1657368CD1	53721617	3.30E-42	[Mus musculus] mac25 insulin-like growth factor binding protein Komatsu S. et al. (2000) Biochem Biophys Res Commun 267:109-117 [Homo sapiens] ba188L7.1 (novel Insulin-like growth factor binding type protein with karal-type serine protease inhibitor domain) [Rattus norvegicus] neurexin III-alpha
2	4028972CD1	5294600	0	Ushakov Y. A. and Sudhof T. C. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 1993 90:6410-6414 FGF-19 [Homo sapiens]
3	5398353CD1	54514718	1.50E-22	[Nishimura, T. (1999) Biochim. Biophys. Acta 1444:148-151]. [Homo sapiens] FGF-21
4	71234118CD1	53049445 51177164 51438954	1.00E-120 4.00E-59 3.20E-18	[Mus musculus] polydrom protein [Homo sapiens] neuronal pentraxin 1 Omeis, I.A. et al. (1996) Genomics 36:543-545
5	240168CD1	52924601	1.10E-29	[Homo sapiens] hepatocyte growth factor activator inhibitor Shimomura, M. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:6370-6376

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 2 (cont.)

Polypeptide SEQ. ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability score	GenBank Homolog
6	7481107CDL	g632430	7.50E-185	[Bos taurus] cartilage-derived morphogenetic protein
7	7476245CDL	g189228	2.70E-54	Chang, S.C. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:28227-28234 [Homo sapiens] neuregulin B
9	5378618CDL	g4590406	2.90E-19	Krane, I.M. et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:13317-13323 [Drosophila melanogaster] slit protein
		g9309467	0	Kidd, T. et al. (1999) Cell 96:785- 794 [Mus musculus] leucine-rich glioma- inactivated 1 protein precursor

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 3

SEQ ID NO.	Incyta Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
1	1657366CD1	304	T250 Y251 T112 S117 T185	N159 N183 N277	M1-A30 Signal_cleavage: M1-A30 C53-C90 Insulin-like growth factor binding proteins VI21-C168 Kazal-type serine protease inhibitor domain SH3 domain Insulin domain Insulin-like growth factor binding proteins signature L85-G171 Kazal serine protease inhibitors family signature V184-L271 MAC25 FOLLISTATINLIKE PROSTACYCLIN STIMULATING FACTOR	HMMER SPSCAN HMMER_FPAM HMMER_FPAM HMMER_FPAM HMMER_FPAM PROFILESKAN PROFILESKAN BLAST_FRODOM

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
2	402897/CD1	1438	T11 S46 S100 T264 S290 T303 T469 S503 T531 T537 S564 S647 S714 S719 T730 T737 S762 T782 S791 T823 T878 T887 S924 T927 S982 T947 S78 S282 S283 T372 S392 T507 T708 T730 T795 T810 T906 Y273 Y547 Y770 Y860	N58 N105 N761 N403 N592 N776 N940 N943	S662-C673 Asx-Hydroxyl S20-M31 Galactose Type I S20-M31 Galactose Type I SIGNAL_Cleavage: M1-G37 F10-G27, M1365-A1383 Transmembrane domain F55-G174, F291-R420, FA79-N626, L740-T850, F903-D1034, F126-M1201 SIGNAL_Cleavage C92-C234 C651-C683, C1057-C1069 EGF-like domain S647-N658 Type II EGF-like signature E204-C224 COMPLEMENT C9 SIGNATURE F1098-Y1437 II-BETA MEMBRAN G803-G809 C1210-M1328 ALTERNATIVE NEUREXIN PRECURSOR	MOTIFS SPSCAN HMMER HMMER_PPAM HMMER_PPAM BLIMFS_PRINTS BLIMFS_PRINTS BLAST_DOMO BLAST_PRODOM

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Trocyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
3	5328353CD1	208	SL21 T6 T97		signal_cleavage: M1-A27 Fibroblast growth factor FGF_H59-H139 HEPARIN BINDING GROWTH FACTOR FAMILY PR00263B.I80-C94 PR00263C.F100-S112 PR00263D.F117-S136 IL1/HGF FAMILY SIGNATURE PR00262A.P87-H114 PR00262B.H119-H139 HGF/HGF family signature DMF_S126F.P87-G140 GROWTH FACTOR FIBROBLAST MITOGEN SIGNAL HEPARIN BINDING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR PD00631.H59-H139 HGF/FGF FAMILY DM00642.F46603.97-205.S16_P165 DM00642.F46605.59-186.ID32-P165 DM00642.F46677.50-207.G61-H139 DM00642.P09524.5-181.G40-P100	SPSCAN HMMER_PFM BLASTS_PRINTS BLASTS_PRINTS BLASTS_PRINTS PROFILESCAN BLAST_PRODOM BLAST_DOMO

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incycle Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
4	71234116CD1	159	S114 S2 S69 Y75 N86 N85		signal_cleavage: M1-G35 Pentaxin family pentaxin: S80-K141 Pentaxin: family proteins BL00289C:H122-G140 Pentaxin family signature pentaxin.ppf:V100-A147 PENTAXIN SIGNATURE PR00895A:L58-D72 PR00895C:H122-G140 PRECURSOR SIGNAL PENTAXIN GLYCOPROTEIN PLASMA CREATIVELY CALCIUM ACUTE PHASE PD0021E3:Y48-G157 C-REACTIVE PROTEIN DM00835 P47971 194-431:F36-I155 DM00835 P47970 187-426:N37-I155	SPSCAN HMMER_PFM BLIMPS_BLOCKS PROFLESCAN BLIMPS_PRINTS BLAST_PRODOM BLAST_DOMO

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
6	7481107CD1	455	S106 S120 S129 S156 S284 S33 S355 S39 S393 S45 T3 T336	N114	<p>FGF-BETA FAMILY DM00245 P43026 174-501:R331-R455, I99-G298 DM00245 P12644 95-408:R332-R455, A124-V217 DM00245 P12643 88-396:R345-R455, Q119-V217, I05-409:R331-R455, A124-V217 K20:R331-R455, A124-V217 GLYCOPROTEIN RECEPTOR SIGNAL GROWTH FACTOR PROTEIN CYTOKINE BETA BONE MORPHOGENETIC PD000357:C334-R455 FGF-beta family proteins BL00250:C354-F389, C419-C454</p> <p>GROWTH FACTOR CYSTEINE KNOT SUPERFAMILY SIGNATURE PR00438:E379-D388, E450-C454 INHIBIN ALPHA CHAIN SIGNATURE PR00669:C354-R374 signal peptide signal peptide:HL-G22 transforming growth factor beta-like like FGF-beta:C394-R455 FGF-beta propeptide:G61-R368 FGF-beta:1372-C387</p>	BLAST_DDBP BLAST_PRODOM BLIMPS_BLOCKS BLIMPS_PELNFS HMMER HMMER_PFM MOTIFS

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
7	7476245CD1	121	S76		BOMBESIN-LIKE PEPTIDES FAMILY DM00828 F08949 18-55:A18-M56 NEUROMEDIN B32 PRECURSOR CONTAINS: B BOMBESIN FAMILY SIGNAL PEPTIDE: H1-D30 OR BASIC RESIDUES: SGGRA4 PDD54439:G57-K121 NEUROMEDIN B32 CONTAINS: B BOMBESIN FAMILY AMIDATION PRECURSOR CLEAVAGE ON PDD26110:A25-M56 Bombesin-like peptides family proteins PDD0237:R98-M56 Bombesin-like peptide signal peptide: H1-D30 Bombesin:W50-G56 Bombesin-like peptides family signature bombesin.ppf.D30-R81 Specan signal_cleavage:K1-P26	BLAST_DOWO BLAST_PRODOM
8	5819744CD1	55	S12 S17 Q2		Parathyroid hormone family signature Signal peptide: H1-P50 Specan signal_cleavage:K1-P51	PROFILESCAN SPSCAN

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
9	5375618CD1	535	S154 S158 S238 S345 S366 S390 S404 S405 S425 S471 S528 T188 T209 T216 T374 W518 T72	N186 N271 N402 N70	Leucine-rich repeat signature PR00019:L156-F169, L135-L148 signal peptide Leucine Rich Repeat LR:D62-F85, S86-F109, H110-R133, D134-D157 Leucine rich repeat C-terminal domain DR02:W167-W216 Spacan signal_cleavage:ML-L23 Atp_Gtp_A binding site:A526-T533	BLIMPS_PRINTS HMMER HMMER_FFAM SPSCAN MOTIFS

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 4

Poly-nucleotide SEQ ID NO:	Nucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	Position	Position
10	1657368CBI	1374	1279-1374	7185657HL (BONERFC01)	32	571
				1657373HL (UREATTU01)	1	227
				2657316F6 (LUNGNOT03)	833	1374
				5851853HL (FZBAUNFG2)	684	942
				GNN_96567325_000005_006	199	1113
				2304925F6 (MGANNPT01)	4158	4541
				7003782D1	3771	4463
				70032296D1	3448	3716
				74865274G (BRARDIR01)	3629	4158
				70503718V1	3106	2672
11	4028972CBI	4541	916-2416, 1-158, 2747-3709	6608073HL (BRAXDIC01)	3083	3519
				70505907V1	2705	3333
				70505907V1	1413	2072
				6993321HL (BRAQUDR02)	1	561
				70501222V1	784	1409
				70504766V1	1385	2066
				70504213V1	1987	2655
				70505588V1	2429	3132
				71281268V1	1	611
				71137050V1	1	682
12	5398353CBI	1117	485-916, 1-75, 990-1117, 157-211	1154616V1	562	1117
				1154616V1	562	1117
				40630370B (LXVFTU13)	1798	1664
				71008652V1 (BRAINOT21)	1798	2066
				71008652V1	219	636
				71233448V1	1	590
				71010865V1	1150	1745
				5647010F8 (BRAITUT23)	1737	2360
				71009374V1	878	1560
				71008946V1	899	1085
13	71234118CBI	2460	3070-3175, 1-38, 1492-1726, 1395, 1534, 156-1013, 2405-2460	71010865V1	1150	1745
				5647010F8 (BRAITUT23)	1737	2360
				71009374V1	878	1560
				71008946V1	899	1085
				71010865V1	1150	1745
				5647010F8 (BRAITUT23)	1737	2360
				71009374V1	878	1560
				71008946V1	899	1085
				71010865V1	1150	1745
				5647010F8 (BRAITUT23)	1737	2360

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 4 (cont.)

Poly-nucleotide SEQ ID NO:	Incyte Poly-nucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment (s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
14	240166CB1	2601	582-648, 1-45, 706-794	32703BHI (BPZNF001) 633332F3 (BRATN001) 191603E6 (LAVR001) 176083F6 (LAVR001) 676433019 (BRANOR01) 191390H1 (PROST04) 697577H1 (BRAHVR04) 7070876H1 (BRAHVR02) 7653484H1 (UTRDM06) GNNL9776804_000033_002 1451205F6 (PENTV01) GNNL9843994_000008_002 edit_1	1348 5427 2680 2189 457 2340 1357 2035 1545 471 147 1618 2310 1029	1656 2680 2680 2680 1344 2587 1545 471 759 2310 2396
15	748110CB1	2791	1-1112, 2425-2791, 1641-1883, 1598-1658	1387540F6 (CHRGD02) 682348E6 (BRANOR04) 237775F6 (LSLTP0109) 1571577F6 (LNOG003) 5813552F8 (PROST0523) 5813552F8 (PROST0523) 6718171H1 (CONPT002) GNNL94416547_000001_4 8264863U1 F55378618_94416547_94091 849 GBL94416547.fasta.edit 70657337V1	2188 2165 427 411 1 554 210 1805 2901 78 1683 78	2781 2781 427 709 753 753 636 2358 3413 1715 2349 1745
16	7476245CB1	709	651-709			
17	5819744CB1	753	1-753			
18	5378618CB1	3413	3392-3413, 1-1039, 1696-2626			

Table 5

Polynucleotide SEQ. ID NO.	Incyte Project ID	Representative Library
10	1657368CB1	LUNGN0723
11	4028972CB1	BRABLR01
12	5398353CB1	LIVRUT13
13	7123411CB1	PLACN0B01
14	240168CB1	LIVRUT01
15	2481107CB1	CARGUT02
16	7478245CB1	BRATUT12
17	5819744CB1	PROSTU523
18	3378618CB1	BRSTUT03

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 6

Library	Vector	Library Description
BRAEDIR01	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from diseased cerebellum tissue removed from the brain of a 57-year-old Caucasian male, who died from a cerebrovascular accident. Patient history included Huntington's disease, emphysema, and tobacco abuse.
BRAITUT12	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from brain tumor tissue removed from the left frontal lobe of a 40-year-old Caucasian female during excision of a cerebral meningelial lesion. Pathology indicated meningioma.
BRSWTUT03	PSPORT1	Library was constructed using RNA isolated from breast tumor tissue removed from a 58-year-old Caucasian female during a unilateral extended simple mastectomy. Pathology indicated multicentric invasive grade 4 lobular carcinoma. The mass was identified in the upper outer quadrant, and three separate nodules were found in the lower outer quadrant of the left breast. Patient history included skin cancer, rheumatic heart disease, osteoarthritis, and osteoporosis. Family history included breast cancer, prostate cancer, atherosclerotic coronary artery disease, and type I diabetes.
CARGDIT02	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from cartilage obtained from 4 donors with end-stage osteoarthritis. The patients had received a variety of non-steroidal anti-inflammatory drugs.
LIVRUTU01	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from liver tumor tissue removed from a 51-year-old Caucasian female during a hepatic lobectomy. Pathology indicated metastatic grade 3 adenocarcinoma consistent with colon cancer. Family history included a malignant neoplasm of the liver.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
LIVER0113	pIN1	Library was constructed using RNA isolated from liver tumor tissue removed from a 68-year-old Caucasian female during partial hepatectomy and exploratory laparotomy. Pathology indicated metastatic intermediate grade neuroendocrine carcinoma, consistent with islet cell tumor, forming nodules ranging in size, in the lateral and medial left liver lobe. The pancreas showed fibrosis, chronic inflammation and fat necrosis consistent with pseudocyst. The gall bladder showed mild chronic cholecystitis. Patient history included malignant neoplasm of the pancreas tail, pulmonary myeloid metaplasia, benign hypertension, joint osteoarthritis, multiple sclerosis, osteoporosis, and secondary cardiovascular disease. Family history included pancreas cancer, secondary liver cancer, benign hypertension, and hyperlipidemia.
LUNG0023	pIN1	Library was constructed using RNA isolated from left lobe lung tissue removed from a 58-year-old Caucasian male. Pathology for the associated tumor tissue indicated metastatic grade 3 (of 4) osteosarcoma. Patient history included soft tissue cancer, secondary cancer of the lung, prostate cancer, and an acute duodenal ulcer etiology. Family history included prostate cancer, breast cancer, and acute leukemia.
PLAC0001	PELUSCRIPT	Library was constructed using RNA isolated from placenta.

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
PROS10523	pINCl	<p>Anti-metastatic prostate tumor library was constructed using 10 million cloned prostate tumor cDNAs. The library was subjected to 2 rounds of subtractive hybridization with 10 million clones from a pooled prostate tissue library. The starting library for subtraction was constructed by pooling equal numbers of clones from 4 prostate tumor libraries using mRNA isolated from prostate tumor removed from Caucasian males at ages 58 (A), 61 (B), 66 (C), and 68 (D) during prostatectomy with lymph node excision. Pathology indicated adenocarcinoma in all donors. History includes elevated PSA, induration, hypercholesterolemia, renal failure, osteoarthritis, benign prostatic hyperplasia, renal artery stenosis, hyperlipidemia, tobacco/alcohol abuse and hepatitis C (carrier) in donor B; elevated PSA, induration, and tobacco abuse in donor C; and elevated PSA, induration, hypercholesterolemia, and kidney calculus in donor D. The hybridization probe for subtraction was constructed by pooling equal numbers of cDNA clones from 3 prostate tissue libraries (donor B, C, and D) from prostatectomy. The starting library for subtraction was constructed from prostatectomy from 3 different donors. Subtractive hybridization conditions were based on the methodologies of Swarcop et al., <i>NAR</i> 19 (1991):1954 and Bonaldo, et al., <i>Genome Research</i> 6 (1996):791.</p>

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 7

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ABI FACTURA	A program that removes vector sequences and masks ambiguous bases in nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	A Fast Data Finder useful in comparing and annotating amino acid or nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	Mismatch <50%
ABI AutoAssembler	A program that assembles nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	A Basic Local Alignment Search Tool useful in sequence similarity search for amino acid and nucleic acid sequences. BLAST includes five functions: blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx.	Altschul, S.F. et al. (1990) <i>J. Mol. Biol.</i> 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:3389-3402.	EST: Probability value= 1.0E-8 or less Full Length sequence: Probability value= 1.0E-10 or less
FASTA	A Pearson and Lipman algorithm that searches for similarity between a query sequence and a group of sequences of the same type. FASTA comprises at least five functions: fasta, dfast, fastx, fasty, and search.	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) <i>Methods Enzymol.</i> 185:69-98; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489.	EST: fasta E value=1.0E-6 Assembled EST: fasta Identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater, fasta E value=1.0E-8 or less Full Length sequence: fasta score=100 or greater
BLIMPS	A BLocks IMProved Searcher that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DDMO, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) <i>Nucleic Acids Res.</i> 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) <i>Methods Enzymol.</i> 266:88-105; and Atwood, T.K. et al. (1997) <i>J. Chem. Inf. Comput. Sci.</i> 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
HMMER	An algorithm for searching a query sequence against hidden Markov model (HMM)-based databases of protein family consensus sequences, such as PFAM.	Krogh, A. et al. (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 235:1501-1531; Somhammer, E.L.L. et al. (1988) <i>Nucleic Acids Res.</i> 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) <i>Our World View</i> , in a Nussbell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-330.	PFAM hit: Probability value= 1.0E-3 or less Signal peptide hit: Score= 0 or greater

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Table 7 (cont.)

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ProfileScan	An algorithm that searches for structural and sequence motifs in protein sequences that match sequence patterns defined in Prosite.	Gribisov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gribisov, M. et al. (1989) <i>Molecular Enzymol.</i> 183:146-159; Baroch, A. et al. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:217-221.	Normalized quality score: CCG-specified "HIGH" value for that particular Prosite motif. Generally, score=1.4-2.1.
Phred	A base-calling algorithm that examines automated sequencer traces with high sensitivity and probability.	Ewing, B. et al. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) <i>Genome Res.</i> 8:186-194.	
Phrap	A Phis Revised Assembly Program including SWAT and CrossMatch, programs based on efficient implementation of the Smith-Waterman algorithm, useful in searching sequence homology and assembling DNA sequences.	Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) <i>J. Mol. Biol.</i> 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	Score= 120 or greater; Match length= 56 or greater
Conseq	A graphical tool for viewing and editing Phrap assemblies.	Gordon, D. et al. (1998) <i>Genome Res.</i> 8:195-202.	
SPScan	A weight matrix analysis program that scans protein sequences for the presence of secretory signal peptides.	Nielson, H. et al. (1997) <i>Protein Engineering</i> 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) <i>CABIOS</i> 12:431-439.	Scores=3.5 or greater
TMAP	A program that uses weight matrices to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Persson, B. and P. Argos (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) <i>Protein Sci.</i> 5:365-371.	
TMHMMER	A program that uses a hidden Markov model (HMM) to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Somhammer, E.L. et al. (1998) <i>Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol.</i> , Glasgow et al., eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	A program that searches amino acid sequences for patterns that matched those defined in Prosite.	Baroch, A. et al. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

WO 01/94587

PCT/US01/18476

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:
 - a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of
5 SEQ ID NO:1-9,
 - b) a naturally occurring polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90%
identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9,
 - c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected
from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and
 - 10 d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from
the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
- 15 3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.
5. An isolated polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of SEQ ID
20 NO:10-18.
6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a
polynucleotide of claim 3.
- 25 7. A cell transformed with a recombinant polynucleotide of claim 6.
8. A transgenic organism comprising a recombinant polynucleotide of claim 6.
9. A method for producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - 30 a) culturing a cell under conditions suitable for expression of the polypeptide, wherein said
cell is transformed with a recombinant polynucleotide, and said recombinant polynucleotide
comprises a promoter sequence operably linked to a polynucleotide encoding the polypeptide of claim
1, and
 - 35 b) recovering the polypeptide so expressed.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

10. An isolated antibody which specifically binds to a polypeptide of claim 1.
11. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:
- a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting
 - 5 of SEQ ID NO:10-18,
 - b) a naturally occurring polynucleotide comprising a polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18,
 - c) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),
 - d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b), and
 - 10 e) an RNA equivalent of a)-d).
12. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11.
13. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide
- 15 having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:
- a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization
 - 20 complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and
 - b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.
14. A method of claim 13, wherein the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.
- 25
15. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:
- a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain reaction amplification, and
 - 30 b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.
16. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.
- 35

WO 01/94587

PCT/US01/18476

17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 16.

19. A method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

- 10 a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
b) detecting agonist activity in the sample.

20. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 19 and a pharmaceutically acceptable excipient.

15

21. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 20.

22. A method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

- 20 a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
b) detecting antagonist activity in the sample.

23. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.

25

24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional XMES, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 23.

30

25. A method of screening for a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1, said method comprising the steps of:

- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

b) detecting binding of the polypeptide of claim 1 to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1.

26. A method of screening for a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1, said method comprising:

- 5 a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide of claim 1,
- b) assessing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound, and
- 10 c) comparing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide of claim 1 in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

27. A method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence of claim 5, the method comprising:

- 15 a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,
- b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and
- 20 c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

28. A method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising:

- a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound;
- 25 b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim 11 or fragment thereof;
- 30 c) quantifying the amount of hybridization complex; and
- d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

29. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of XMES in a biological sample comprising the steps of:
- a) combining the biological sample with an antibody of claim 10, under conditions suitable
 - 5 for the antibody to bind the polypeptide and form an antibody:polypeptide complex; and
 - b) detecting the complex, wherein the presence of the complex correlates with the presence of the polypeptide in the biological sample.
30. The antibody of claim 10, wherein the antibody is:
- 10 a) a chimeric antibody,
 - b) a single chain antibody,
 - c) a Fab fragment,
 - d) a F(ab')₂ fragment, or
 - 15 e) a humanized antibody.
31. A composition comprising an antibody of claim 10 and an acceptable excipient.
32. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of XMES in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim
- 20 31.
33. A composition of claim 31, wherein the antibody is labeled.
34. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of XMES in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim
- 25 33.
35. A method of preparing a polyclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 10 comprising:
- 30 a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;
 - b) isolating antibodies from said animal; and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

c) screening the isolated antibodies with the polypeptide, thereby identifying a polyclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

5 36. An antibody produced by a method of claim 35.

37. A composition comprising the antibody of claim 36 and a suitable carrier.

38. A method of making a monoclonal antibody with the specificity of the antibody of claim
10 comprising:

a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;

b) isolating antibody producing cells from the animal;

15 c) fusing the antibody producing cells with immortalized cells to form monoclonal antibody-producing hybridoma cells;

d) culturing the hybridoma cells; and

e) isolating from the culture monoclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

20

39. A monoclonal antibody produced by a method of claim 38.

40. A composition comprising the antibody of claim 39 and a suitable carrier.

25 41. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.

42. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a recombinant immunoglobulin library.

30

43. A method for detecting a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 in a sample, comprising the steps of:

a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and

WO 01/94587

PCT/US01/18476

- b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 in the sample.
- 5 44. A method of purifying a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 from a sample, the method comprising:
- a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and
- b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide having an
- 10 amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
45. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.
46. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
- 15 47. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.
48. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
49. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5.
- 20 50. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.
51. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.
- 25 52. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.
53. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.
- 30 54. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:10.
55. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:11.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

56. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
NO:12.

57. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
5 NO:13.

58. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
NO:14.

59. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
10 NO:15.

60. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
NO:16.

61. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
15 NO:17.

62. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID
20 NO:18.

WO 01/94587

PCT/US01/18476

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 LAL, Preeti
 YUE, Henry
 HE, Ann
 NGUYEN, Daniel B.
 WALIA, Narinder
 GANDHI, Ameena R.
 AZIMZAI, Yalga
 BANDEMAN, Olga
 TANG, Y. Tom
 LI, Yan
 BAUGHN, Mariah R.
 DUGGAN, Brendan M.
 LEE, Sally
 HAFALIA, April
 POLICKY, Jennifer L.

<120> EXTRACELLULAR MESSENGERS

<130> PF-0780 PCT.

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/210,233; 60/213,465; 60/249,019
 <151> 2000-06-06; 2000-06-23; 2000-11-14

<160> 18
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1657368CD1

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

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Asp	Ile	Gln	Leu	Pro	Gly	Asp	Asp	Pro	His	Ile	Ser	Val	Gln	Phe	210
															215
Arg	Gly	Gly	Pro	Gln	Arg	Phe	Glu	Val	Thr	Gly	Trp	Leu	Gln	Ile	225
															230
Gln	Ala	Val	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Leu	Gly	240
															245
Arg	Asn	Ala	Leu	Gly	Gln	Val	Glu	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	Val	250
															255
Leu	Thr	Pro	Asp	Gln	Leu	Asn	Ser	Thr	Gly	Ile	Pro	Gln	Leu	Arg	260
															265
Ser	Leu	Asn	Leu	Val	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Ser	Glu	Glu	Asn	270
															275
Asp	Asp	Tyr	Tyr												280
															285
															290
															295
															300

<210> 2

<211> 1438

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 4028972CD1

<400> 2

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

WO 01/94587

PCT/US01/18476

305	310	315
Asp Gly Ala Val Ser	Leu Val Ile Asn Leu Gly Ser Gly Ala	Phe
320	325	330
Glu Ala Ile Val Glu	Pro Val Asn Gly Lys Phe Asn Asp Asn	Ala
335	340	345
Trp His Asp Val Lys	Val Thr Arg Asn Leu Arg Gln Val Thr	Ile
350	355	360
Ser Val Asp Gly Ile	Leu Thr Thr Thr Gly Tyr Thr Gln Glu	Asp
365	370	375
Tyr Thr Met Leu Gly	Ser Asp Asp Phe Phe Tyr Val Gly Gly	Ser
380	385	390
Pro Ser Thr Ala Asp	Leu Pro Gly Ser Pro Val Ser Asn Asn	Phe
395	400	405
Met Gly Cys Leu Lys	Glu Val Val Tyr Lys Asn Asn Asp Ile	Arg
410	415	420
Leu Glu Leu Ser Arg	Leu Ala Arg Ile Ala Asp Thr Lys Met	Lys
425	430	435
Ile Tyr Gly Glu Val	Val Phe Lys Cys Glu Asn Val Ala Thr	Leu
440	445	450
Asp Pro Ile Asn Phe	Glu Thr Pro Glu Ala Tyr Ile Ser Leu	Pro
455	460	465
Lys Trp Asn Thr Lys	Arg Met Gly Ser Ile Ser Phe Asp Phe	Arg
470	475	480
Thr Thr Glu Pro Asn	Gly Leu Ile Leu Phe Thr His Gly Lys	Pro
485	490	495
Gln Glu Arg Lys Asp	Ala Arg Ser Gln Lys Asn Thr Lys Val	Asp
500	505	510
Phe Phe Ala Val Glu	Leu Leu Asp Gly Asn Leu Tyr Leu Leu	Leu
515	520	525
Asp Met Gly Ser Gly	Thr Ile Lys Val Lys Ala Thr Gln Lys	Lys
530	535	540
Ala Asn Asp Gly Glu	Trp Tyr His Val Asp Ile Gln Arg Asp	Gly
545	550	555
Arg Ser Gly Thr Ile	Ser Val Asn Ser Arg Arg Thr Pro Phe	Thr
560	565	570
Ala Ser Gly Glu Ser	Glu Ile Leu Asp Leu Glu Gly Asp Met	Tyr
575	580	585
Leu Gly Gly Leu Pro	Glu Asn Arg Ala Gly Leu Ile Leu Pro	Thr
590	595	600
Glu Leu Trp Thr Ala	Met Leu Asn Tyr Gly Tyr Val Gly Cys	Ile
605	610	615
Arg Asp Leu Phe Ile	Asp Gly Arg Ser Lys Asn Ile Arg Gln	Leu
620	625	630
Ala Glu Met Gln Asn	Ala Ala Gly Val Lys Ser Ser Cys Ser	Arg
635	640	645
Met Ser Ala Lys Gln	Cys Asp Ser Tyr Pro Cys Lys Asn Asn	Ala
650	655	660
Val Cys Lys Asp Gly	Trp Asn Arg Phe Ile Cys Asp Cys Thr	Gly
665	670	675
Thr Gly Tyr Trp Gly	Arg Thr Cys Glu Arg Glu Ala Ser Ile	Leu
680	685	690
Ser Tyr Asp Gly Ser	Met Tyr Met Lys Ile Ile Met Pro Met	Val
695	700	705
Met His Thr Glu Ala	Glu Asp Val Ser Phe Arg Phe Met Ser	Gln
710	715	720
Arg Ala Tyr Gly Leu	Leu Val Ala Thr Thr Ser Arg Asp Ser	Ala
725	730	735
Asp Thr Leu Arg Leu	Glu Leu Asp Gly Gly Arg Val Lys Leu	Met
740	745	750
Val Asn Leu Asp Cys	Ile Arg Ile Asn Cys Asn Ser Ser Lys	Gly
755	760	765
Pro Glu Thr Leu Tyr	Ala Gly Gln Lys Leu Asn Asp Asn Glu	Trp
770	775	780
His Thr Val Arg Val	Val Arg Arg Gly Lys Ser Leu Lys Leu	Thr
785	790	795
Val Asp Asp Asp Val	Ala Glu Gly Thr Met Val Gly Asp His	Thr
800	805	810

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Arg Leu Glu Phe His Asn Ile Glu Thr Gly Ile Met Thr Glu Lys 815 820 825
 Arg Tyr Ile Ser Val Val Pro Ser Ser Phe Ile Gly His Leu Gln 830 835 840
 Ser Leu Met Phe Asn Gly Leu Leu Tyr Ile Asp Leu Cys Lys Asn 845 850 855
 Gly Asp Ile Asp Tyr Cys Glu Leu Lys Ala Arg Phe Gly Leu Arg 860 865 870
 Asn Ile Ile Ala Asp Pro Val Thr Phe Lys Thr Lys Ser Ser Tyr 875 880 885
 Leu Ser Leu Ala Thr Leu Gln Ala Tyr Thr Ser Met His Leu Phe 890 895 900
 Phe Gln Phe Lys Thr Thr Ser Pro Asp Gly Phe Ile Leu Phe Asn 905 910 915
 Ser Gly Asp Gly Asn Asp Phe Ile Ala Val Glu Leu Val Lys Gly 920 925 930
 Tyr Ile His Tyr Val Phe Asp Leu Gly Asn Gly Pro Asn Val Ile 935 940 945
 Lys Gly Asn Ser Asp Arg Pro Leu Asn Asp Asn Gln Trp His Asn 950 955 960
 Val Val Ile Thr Arg Asp Asn Ser Asn Thr His Ser Leu Lys Val 965 970 975
 Asp Thr Lys Val Val Thr Gln Val Ile Asn Gly Ala Lys Asn Leu 980 985 990
 Asp Leu Lys Gly Asp Leu Tyr Met Ala Gly Leu Ala Gln Gly Met 995 1000 1005
 Tyr Ser Asn Leu Pro Lys Leu Val Ala Ser Arg Asp Gly Phe Gln 1010 1015 1020
 Gly Cys Leu Ala Ser Val Asp Leu Asn Gly Arg Leu Pro Asp Leu 1025 1030 1035
 Ile Asn Asp Ala Leu His Arg Ser Gly Gln Ile Glu Arg Gly Cys 1040 1045 1050
 Glu Gly Pro Ser Thr Thr Cys Gln Glu Asp Ser Cys Ala Asn Gln 1055 1060 1065
 Gly Val Cys Met Gln Gln Trp Glu Gly Phe Thr Cys Asp Cys Ser 1070 1075 1080
 Met Thr Ser Tyr Ser Gly Asn Gln Cys Asn Asp Pro Gly Ala Thr 1085 1090 1095
 Tyr Ile Phe Gly Lys Ser Gly Gly Leu Ile Leu Tyr Thr Trp Pro 1100 1105 1110
 Ala Asn Asp Arg Pro Ser Thr Arg Ser Asp Arg Leu Ala Val Gly 1115 1120 1125
 Phe Ser Thr Thr Val Lys Asp Gly Ile Leu Val Arg Ile Asp Ser 1130 1135 1140
 Ala Pro Gly Leu Gly Asp Phe Leu Gln Leu His Ile Glu Gln Gly 1145 1150 1155
 Lys Ile Gly Val Val Phe Asn Ile Gly Thr Val Asp Ile Ser Ile 1160 1165 1170
 Lys Glu Glu Arg Thr Pro Val Asn Asp Gly Lys Tyr His Val Val 1175 1180 1185
 Arg Phe Thr Arg Asn Gly Gly Asn Ala Thr Leu Gln Val Asp Asn 1190 1195 1200
 Trp Pro Val Asn Glu His Tyr Pro Thr Gly Arg Gln Leu Thr Ile 1205 1210 1215
 Phe Asn Thr Gln Ala Gln Ile Ala Ile Gly Gly Lys Asp Lys Gly 1220 1225 1230
 Arg Leu Phe Gln Gly Gln Leu Ser Gly Leu Tyr Tyr Asp Gly Leu 1235 1240 1245
 Lys Val Leu Asn Met Ala Ala Glu Asn Asn Pro Asn Ile Lys Ile 1250 1255 1260
 Asn Gly Ser Val Arg Leu Val Gly Glu Val Pro Ser Ile Leu Gly 1265 1270 1275
 Thr Thr Gln Thr Thr Ser Met Pro Pro Glu Met Ser Thr Thr Val 1280 1285 1290
 Met Glu Thr Thr Thr Thr Met Ala Thr Thr Thr Arg Lys Asn 1295 1300 1305
 Arg Ser Thr Ala Ser Ile Gln Pro Thr Ser Asp Asp Leu Val Ser

WO 01/94587

PCT/US01/18476

1310 1315 1320
 Ser Ala Glu Cys Ser Ser Asp Asp Glu Asp Phe Val Glu Cys Glu
 1325 1330 1335
 Pro Ser Thr Ala Asn Pro Thr Glu Pro Gly Ile Arg Arg Val Pro
 1340 1345 1350
 Gly Ala Ser Glu Val Ile Arg Glu Ser Ser Ser Thr Thr Gly Met
 1355 1360 1365
 Val Val Gly Ile Val Ala Ala Ala Ala Leu Cys Ile Leu Ile Leu
 1370 1375 1380
 Leu Tyr Ala Met Tyr Lys Tyr Arg Asn Arg Asp Glu Gly Ser Tyr
 1385 1390 1395
 Gln Val Asp Glu Thr Arg Asn Tyr Ile Ser Asn Ser Ala Gln Ser
 1400 1405 1410
 Asn Gly Thr Leu Met Lys Glu Lys Gln Gln Ser Ser Lys Ser Gly
 1415 1420 1425
 His Lys Lys Gln Lys Asn Lys Asp Arg Glu Tyr Tyr Val
 1430 1435

<210> 3
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5398353CD1

<400> 3
 Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val
 1 5 10 15
 Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile
 20 25 30
 Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln
 35 40 45
 Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu
 50 55 60
 Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 65 70 75
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile
 80 85 90
 Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
 95 100 105
 Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys
 110 115 120
 Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln
 125 130 135
 Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser
 140 145 150
 Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro
 155 160 165
 Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu
 170 175 180
 Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met
 185 190 195
 Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 200 205

<210> 4
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 71234118CD1

<400> 4

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Met Ser Phe Phe Asp Asn Ser Thr Ala Ser Ser Asp Asn Trp Lys
 1 5 10 15
 Cys Leu Ser Ser Ala Thr Val Cys Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ala
 20 25 30
 Glu Gln Ser Thr Gly Phe Asn Leu Asp Phe Glu Val Ser Gly Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Tyr Val Met Leu Asp Gly Met Leu Pro Ser Leu His Ala
 50 55 60
 Leu Thr Cys Thr Phe Trp Met Lys Ser Ser Asp Asp Met Asn Tyr
 65 70 75
 Gly Thr Pro Ile Ser Tyr Ala Val Asp Asn Gly Ser Asp Asn Thr
 80 85 90
 Leu Leu Leu Thr Asp Tyr Asn Gly Trp Val Leu Tyr Val Asn Gly
 95 100 105
 Arg Glu Lys Ile Thr Asn Cys Pro Ser Val Asn Asp Gly Arg Trp
 110 115 120
 His His Ile Ala Ile Thr Trp Thr Ser Ala Asn Gly Ile Trp Lys
 125 130 135
 Val Tyr Ile Asp Gly Lys Leu Ser Asp Gly Gly Ala Gly Leu Ser
 140 145 150
 Val Gly Leu Pro Ile Pro Gly Met Phe
 155

<210> 5
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 240168CD1

<400> 5
 Met Ala Ser Val Ala Gln Glu Ser Ala Gly Ser Gln Arg Arg Leu
 1 5 10 15
 Pro Pro Arg His Gly Ala Leu Arg Gly Leu Leu Leu Cys Leu
 20 25 30
 Trp Leu Pro Ser Gly Arg Ala Ala Leu Pro Pro Ala Ala Pro Leu
 35 40 45
 Ser Glu Leu His Ala Gln Leu Ser Gly Val Glu Gln Leu Leu Glu
 50 55 60
 Glu Phe Arg Arg Gln Leu Gln Gln Glu Arg Pro Gln Glu Glu Leu
 65 70 75
 Glu Leu Glu Leu Arg Ala Gly Gly Gly Pro Gln Glu Asp Cys Pro
 80 85 90
 Gly Pro Gly Ser Gly Gly Tyr Ser Ala Met Pro Asp Ala Ile Ile
 95 100 105
 Arg Thr Lys Asp Ser Leu Ala Ala Gly Ala Ser Phe Leu Arg Ala
 110 115 120
 Pro Ala Ala Val Arg Gly Trp Arg Gln Cys Val Ala Ala Cys Cys
 125 130 135
 Ser Glu Pro Arg Cys Ser Val Ala Val Val Glu Leu Pro Arg Arg
 140 145 150
 Pro Ala Pro Pro Ala Ala Val Leu Gly Cys Tyr Leu Phe Asn Cys
 155 160 165
 Thr Ala Arg Gly Arg Asn Val Cys Lys Phe Ala Leu His Ser Gly
 170 175 180
 Tyr Ser Ser Tyr Ser Leu Ser Arg Ala Pro Asp Gly Ala Ala Leu
 185 190 195
 Ala Thr Ala Arg Ala Ser Pro Arg Gln Glu Lys Asp Ala Pro Pro
 200 205 210
 Leu Ser Lys Ala Gly Gln Asp Val Val Leu His Leu Pro Thr Asp
 215 220 225
 Gly Val Val Leu Asp Gly Arg Glu Ser Thr Asp Asp His Ala Ile
 230 235 240
 Val Gln Tyr Glu Trp Ala Leu Leu Gln Gly Asp Pro Ser Val Asp
 245 250 255

WO 01/94587

PCT/US01/18476

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

<210> 6
 <211> 455
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7481107CD1

<400> 6
 Met Asp Thr Pro Arg Val Leu Leu Ser Ala Val Phe Leu Ile Ser
 1 10 15
 Phe Leu Trp Asp Leu Pro Gly Phe Gln Gln Ala Ser Ile Ser Ser
 20 25 30
 Ser Ser Ser Ser Ala Glu Leu Gly Ser Thr Lys Gly Met Arg Ser
 35 40 45
 Arg Lys Glu Gly Lys Met Gln Arg Ala Pro Arg Asp Ser Asp Ala
 50 55 60
 Gly Arg Glu Gly Gln Glu Pro Gln Pro Arg Pro Gln Asp Glu Pro
 65 70 75
 Arg Ala Gln Gln Pro Arg Ala Gln Glu Pro Pro Gly Arg Gly Pro
 80 85 90
 Arg Val Val Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Ile Tyr Arg Thr Tyr
 95 100 105
 Ser Ile Ala Glu Lys Leu Gly Ile Asn Ala Ser Phe Phe Gln Ser
 110 115 120
 Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Val Asp Arg Gly Leu
 125 130 135
 Asp Asp Leu Ser His Thr Pro Leu Arg Arg Gln Lys Tyr Leu Phe
 140 145 150
 Asp Val Ser Met Leu Ser Asp Lys Glu Glu Leu Val Gly Ala Glu
 155 160 165

WO 01/94587

PCT/US01/18476

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

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7476245CD1

<400> 7
 Met Ala Arg Arg Ala Gly Gly Ala Arg Met Phe Gly Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Ala Leu Leu Ala Ala Gly Val Ala Pro Leu Ser Trp Asp
 20 25 30
 Leu Pro Glu Pro Arg Ser Arg Ala Ser Lys Ile Arg Val His Ser
 35 40 45
 Arg Gly Asn Leu Trp Ala Thr Gly His Phe Met Gly Lys Lys Ser
 50 55 60
 Leu Glu Pro Ser Ser Pro Ser Pro Leu Gly Thr Ala Pro His Thr
 65 70 75
 Ser Leu Arg Asp Gln Arg Leu Gln Leu Ser His Asp Leu Leu Gly
 80 85 90
 Ile Leu Leu Leu Lys Lys Ala Leu Gly Val Ser Leu Ser Arg Pro
 95 100 105
 Ala Pro Gln Ile Gln Tyr Arg Arg Leu Leu Val Gln Ile Leu Gln
 110 115 120

WO 01/94587

PCT/US01/18476

Lys

<210> 8
<211> 55
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5819744CD1

<400> 8
Met Thr Ala Ser Glu Cys Gly Thr Gly Asp Gln Ser Cys Arg Arg
1 5 10 15
Val Ser Trp Val Val Leu Glu Glu Asp Leu Glu Asp Asp Ala Glu
20 25 30
Lys Asp Lys Leu Asn Arg Arg Leu Val Val Leu Leu Gln Leu Leu
35 40 45
Tyr Arg Gly Val Lys Pro Ser Ser Ser Val
50 55

<210> 9
<211> 545
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5378618CD1

<400> 9
Met Ala Leu Arg Arg Gly Gly Cys Gly Ala Leu Gly Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Gly Ala Ala Cys Leu Ile Pro Arg Ser Ala Gln Val
20 25 30
Arg Arg Leu Ala Arg Cys Pro Ala Thr Cys Ser Cys Thr Lys Glu
35 40 45
Ser Ile Ile Cys Val Gly Ser Ser Trp Val Pro Arg Ile Val Pro
50 55 60
Gly Asp Ile Ser Ser Leu Ser Leu Val Asn Gly Thr Phe Ser Glu
65 70 75
Ile Lys Asp Arg Met Phe Ser His Leu Pro Ser Leu Gln Leu Leu
80 85 90
Leu Leu Asn Ser Asn Ser Phe Thr Ile Ile Arg Asp Asp Ala Phe
95 100 105
Ala Gly Leu Phe His Leu Glu Tyr Leu Phe Ile Glu Gly Asn Lys
110 115 120
Ile Glu Thr Ile Ser Arg Asn Ala Phe Arg Gly Leu Arg Asp Leu
125 130 135
Thr His Leu Ser Leu Ala Asn Asn His Ile Lys Ala Leu Pro Arg
140 145 150
Asp Val Phe Ser Asp Leu Asp Ser Leu Ile Glu Leu Asp Leu Arg
155 160 165
Gly Asn Lys Phe Glu Cys Asp Cys Lys Ala Lys Trp Leu Tyr Leu
170 175 180
Trp Leu Lys Met Thr Asn Ser Thr Val Ser Asp Val Leu Cys Ile
185 190 195
Gly Pro Pro Glu Tyr Gln Glu Lys Lys Leu Asn Asp Val Thr Ser
200 205 210
Phe Asp Tyr Glu Cys Thr Thr Thr Asp Phe Val Val His Gln Thr
215 220 225
Leu Pro Tyr Gln Ser Val Ser Val Asp Thr Phe Asn Ser Lys Asn
230 235 240
Asp Val Tyr Val Ala Ile Ala Gln Pro Ser Met Glu Asn Cys Met
245 250 255
Val Leu Glu Trp Asp His Ile Glu Met Asn Phe Arg Ser Tyr Asp

WO 01/94587

PCT/US01/18476

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

<210> 10

<211> 1374

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 1657368CB1

<400> 10

caagttcgt gggctctctc agaagtcctc aggaaggagc agaggtggcc ggccggcccg 60
 gctgactgcy cctctgcttt ctctccataa ccttttcttt cggactgaa tcacggctgc 120
 tgcgaagggt ctatgtccgg acactagggt gcccgaaacc gctgatgcc cagtgctcg 180
 cagggttcc cgctaaccat gctgccgccg ccgcccgcg cagctgctt ggcgctgct 240
 gtgctctgc tactgctggt ggtgctgacg ccgcccgcg ccggcgcaag gccatcccc 300
 ggcccagatt acctgggcgg cggctggatg cggctgctag cggaggcga gggctgct 360
 cctgcccgc cagaagagtg ccgcccgcg cgggctgccc tggcggcag ggtgcccag 420
 gctgcccgt gctgctggga atgcgccaac ctgagggcc agctctgca cctggacccc 480
 agtctcaact tctacgggca ctgcccag cagctgagtg gccgctgga caacggcggc 540
 gacctgacc ccggagaggt gccggaacct ctgtgtcct gctgttcca gactcctc 600
 tgcgggtccg accgtccac ctactcccag atctgcccgc tgcaggagg gcccccgat 660
 cggcccgat ccaacctcac tgtgcccac ccggcccct gccgaatcgg gcccccgatc 720
 gtgtcacatc catatgacac ttggaatgtg acagggcagg atgtgatct ttgctgtgaa 780
 gtgtttgctt accccatggc ctccatcgag tggaggaagg atggcttga catccagctg 840
 ccaggggatg acccccacat ctctgtgag tttaggggtg gaaccacag gtttgaggtg 900
 actggtggc tgcagatcca ggtgtgctt cccagtgat agggcactta ccgctgctt 960
 ggccgaatg ccttgggtca agtggaggcc cctgctagct tgacagtct cacacctgac 1020

WO 01/94587

PCT/US01/18476

```

cagctgaact ctacaggcat cccccagctc cgatcaactaa acctgggtcc tgaggaggag 1080
gctgagagtg aagagaatga cgattactac taggtccaga gctctggccc atgggggtgg 1140
gtgagcggct atagtggtca tccctgctct tgaaaagacc tggaaaaggg agcaggggtcc 1200
ctctcaatgac tgcctcaatg ctgtcagtag gnatgatcat gggaggccca ttgactcca 1260
aggttagcagt ggttaggat agagacaaa gctggagaga ggttaggaga gaaactgaga 1320
ccaggaccgg tgggttacia agggggccat gcaggagata gectggccag tagg 1374

```

```

<210> 11
<211> 4541
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 4028972CB1

```

```

<400> 11
ctgtgtgtgt tgetgecttc ctctgtgtgt cttctgttcc ccccatctct gtctgttctt 60
tcccactctc atggccaag ggagagatcc tctccgggct gttccctggc ctgtctgtctc 120
ctccgggtct tgtcccagca gcgacaatga gctccacact ccactcggct tctctcacc 180
tgaaggtcaag cgtcctgctg ggtccctcgt tgggctctct cctggccttt gagtctcatgg 240
gectcccocaa ccagtgggcc cgtacactcc gctgggatgc cagcacacyc agtgaactga 300
gtttccagtt caagaccaac gctctctcag gctctgctct ctacctggat gatggcggcg 360
tctgagactt cctatgcctc tccctgggtg atggccgctt tcagctccgc ttcagcatgg 420
actgtgccga gaactgcctg ctgtccaaca agcagggtgaa tgcacagcag tggcactctc 480
tcatggtgag ccgtgaccgc ctgcgcacgg tgcctgatct tgatggcgag ggcagctctg 540
gggagctgca gccccaagcg cctcacatg atgtggctag tgactgtctc ctgggtggag 600
tccctactga catagcaact tctgcctcga cctctgatg agtctcaagg atgcccggct 660
tcaaggggtt aattctggat ctcaagatg gaaactcgga gectcggctt ctggggagcc 720
ggggtgtcca gatgatgcc gaggaccctt gtggtgagc tccctgtgaa aatgggtggg 780
ctgtctttct cctggacggc caccaccact gtgactgttc taccactggc tatgggtgca 840
agctctgctc agaagatgct agtcaagatc caggcctctc ccacctcatg atgagtgaac 900
aagttagaag taaagctcga gaggagaatg tggcactctt ccgaggtcga gagtatctgt 960
gctacagact gctcagaac ccgatccaga gcagcagtga tgaatcacc ctctccttta 1020
agactggca ccgtaacggc ctctctctgc acccgggcaa gtcggctgac tatgtcaacc 1080
tggctctgaa gtaggtgtgc gctcctctgg tctctcactc ccattacact ggggtccggg gctcttgagg 1140
coatttgtga gccagtgaa gaaaaattca acgacaacyc ctggcatgat gtaaaagtga 1200
cacgcaacct ccggcaggtg acaatctctg tggatggcat tcttaccacy acggctcaca 1260
ctcaagagga ctataccatg ctggctctcg agcactctt ctatgttaga ggaagcccaa 1320
gtaccgctga ctgcccggcc tccctgtca gcaacaactt catgggctgc cttaaagagg 1380
tgtttataaa gaataatgac atccgtctgg agctgtctcg cctggccggg attgoggaca 1440
ccaagatgaa aatctatggc gaagltgtgt ttaagtgtga gaattggcc acactggacc 1500
ccatcaactt tgagaccocca gaaggttaca tcaagcttgc caagtgcaac actaaagcta 1560
tgggctccat ctctcttgac ttcgcaacca cagagcccaa tggcctgatc ctcttcaact 1620
atggaaagcc ccaagagagg aaggtatgct ggagccagaa gaatacaaaa gtacactctt 1680
tgcagtgga actcctcgat ggcaacctgt acttgcctgt gacatgggc tctggcaca 1740
tcaagtgaa agccaactcag aagaaagcca atgatgggga atggtaccat gtggacattc 1800
agcgagatgg cagatcaggt actatatcag tgaacagcag gcgcacgcca ttcaccgcca 1860
gtgggagag ccagatcctg gacctggaag gagacatgta cctgggaggg ctgcccggaga 1920
accgtgtcgg ccttatctct cccaccagac tctggaactgc catgctaac tatggctcag 1980
tgggctgcat ccgccccta tcaattgag gggcagcaaa gancattcga cagctggcag 2040
agatgcagaa tgetgogggt gtaagctctt cctgttcaag gatgagtgcc aagcagtygt 2100
acagctacc ctcgaagat aatgctgtgt cgaaggaagg ctggaaccgc ttcctctcgg 2160
actgcaccgg caccggatac tggggaagaa cctgcgaaag ggaggcatcc atcctgagct 2220
atgatggtag catgtacatg aagatcatca tgcacctggc catgcatact gaggcagagg 2280
atgtgtcctt ccgctctatg tcccagcgag ctatgggctt gctggtggct acgaactcca 2340
gggactctgc cgaacccctg cgtctggagg tggatggggg gcgtytcaag ctcatgggta 2400
acttagactg tatcaggata aactgttaact ccagcaagg accagagacc ttgtatgag 2460
ggcaagact caatgacnac gactggcaca ccgtccgggt ggtgggaga gaaaaagcc 2520
tbaagttaac cgtggatgat gatgtgctg aggttaacat ggtggagagc cataccogtt 2580
tggagtcca caacattgaa acgggaatca tgaactgaga acgctacatc tccgtttgct 2640
ctccagctt tattggccat ctgcagagcc tcaatgttaa tggcctctc tcaacttgact 2700
tgtcaaaaa tggtagcatt gattatgtg agctgaaggg tctgttttga ctgaggaaca 2760
tcatcgtcga cctgtcacc ttaagacca agagcagcta cctgagcctt gccactctc 2820
aggettaaac ctccatgac ctctctctcc agttcaagac caactcaaca gatgggtcca 2880
tctcttcaa tagtggtagt ggcaatgact tcaatgcagt ccagctgttc aaggggtata 2940
tacactaagt tttgacctc ggaaaogytc ccaatgtgat caaaggcaac agtgaccgcc 3000

```

WO 01/94587

PCT/US01/18476

```

cctcgaatga caaccagtgg cacaatgtcg tcatactcog ggacaatagt aacactcata 3060
gcctgaaagt ggaocacaaa gtgggtcactc aggttatcaa tgggtccaaa aatctggatt 3120
tgaagggtga tctctatatg gctgggtctgg cccaaggcat gtacagcaac ctcccaaaagc 3180
tcgtggcctc tcgagatggc ttccagggctc gtctagcacc agtggacttg aatggacgcc 3240
tgccagacct cctcaatgat gctcttcate gtagcgcaaa gatcgagcgt gctctggaag 3300
gaccagatgc caactgccag gaagattoat gtgccaacca gggggtctgc atgcaacaat 3360
gggaggcctt caactgtgat tgttctatga cctctatcc tggaaacagc tgcattgac 3420
ctggcgctac gtaactcttt gggaaaagtg gtgggcttat cctctacacc tggccagcca 3480
atgacagccc cagcagcggy tctgaccgcc ttggcgtggg cttcagcacc actgtgaagg 3540
atggcatctt ggtccgcate gacagtgtct caggacttgg tgacttcttc cagcttcaca 3600
tagaacaggg gaaaattgga gttgtcttca acattggcaac agttgacacc tccatcaaa 3660
aggagagaac cctgttaaat gacggcaaat accatgttgt acgtctcac aggaacggcg 3720
gaaacggcac cctgcagggt gaaactgtgc cagtgatga acattatcct acagtcggc 3780
agttcaacct ctcaacct caggcgcaaa tagcctatgg tggaaaggac aaagcagccc 3840
tttccaaggy ccaactctct gggctctatt atgatgtttt gaaagtactg aacatggcgg 3900
ctgagaacaa cccaatatt aaaaatcaat gaagtgtctg gctggttgga gaagtcccat 3960
caatcttggg aacaacacag acgacctcca tgcaccaga aatgtctact actgtcattg 4020
aaacactac tacaatggcg actaccacaa ccogtaangaa tegtcttaca gccagcattc 4080
agccaacatc agatgatctt gtttcatctg ctgaaatgttc aagtgtatg gaagactttg 4140
ttagatgtga gccagatcac gcaaacctca cggagccggg acctcagcgg gttccgggg 4200
cctcaagagt gatccggagc tcgagcagca caacagggat ggtcgtcggc attgtgctg 4260
ctgcgcctct ctgcactctg atctctctgt aegccatgta caagtacagg aacagggcag 4320
aggggctccta tcaagtggac gagacggcga actacaatcg caactccgcc cagagcaacg 4380
gcagctcat gaagggagag cagcagagct cgaagagcgg ccacaagaaa cagaaaaaca 4440
aggacagggc gtattacgtg taaacatgcy aacactgtct acacgcgagt ttccagatt 4500
attctatccc agcactatga atctttggac ggtgagatct c 4541

```

```

<210> 12
<211> 1117
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5398353CB1

```

```

<400> 12
ctctgcctag cacatccccc ctcccacctc ctcatccaca aaatgtatag gtttgcataa 60
aataaggtgg aaaattagac agcagcgaga tcatgaaggg tgttgaatga caaccgagtaa 120
atacacttta acctatagaa ttttaaggca aaaagtgagc tatgactctc gcaagcaagc 180
ggtaaagtaa gtccggaatc cggggtcagc gctgtcagct gaggatccag ccgaaagagg 240
agccagggac tcaggccacc ttagctctact caactggaca actggaatct ggcaccaatt 300
ctaaacact cagcttctcc gagctcaacc ccggagatc acctgagac ccgagcaatt 360
gatgactctg gacgagaccg ggttcgagca ctcaggactg tgggtttctg tctctgctgg 420
tctgtctgga cctcgcagg gcaaccccat cctcactctc agtctctcc tgcatttcgg 480
gggccaagtc cggcagcggc acctctacac agatgatgcc cagcagacag aagcccaact 540
ggagatcagg gaggatggga cgggtggggg cgtctctgac cagagccccc aaagtctcct 600
cagctgaaa gcttgaagc cgggagttat tcaaatcttg gtagtcaaga catccaggtt 660
cctgtgccag cggccagatg gggccctgta tggatcgtct caetttgacc ctgaggcctg 720
cagcttccgg gagctgcttc ttagggacgg atacaatgtt tccagctcc aagcccaagg 780
ctctcgtg cacttgcag ggaacaagt cccaacagc gacctgtac ccgagagacc 840
agctcgtctc ctgccaactc caggcctgcc ccccgcactc ccggagccac ccggaatcct 900
ggcccccaag cccccgatg tgggctctct ggacctctg agcatgttgg gaccttccca 960
ggccgaagc ccaagctacg cttcttgaag ccagagcgtg ttactatga catctctct 1020
ttatttatta gtttatttat cttatttatt ttttattttt ctactctgag ataataaaga 1080
gttccagagg agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1117

```

```

<210> 13
<211> 2460
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 71234118CB1

```

<220>

WO 01/94587

PCT/US01/18476

<221> unsure

<222> 2443

<223> a, t, c, g, or other

<400> 13

```

cotgtgtgca gctggcttca caggatcaca ctgtgaattg aacatcaatg aatgtcaagt 60
taatccatgt agaaatcagg ccacotgtgt ggatgaatta aatcctacaa gttgttaaatg 120
tcagccagga ttttcaggca aaaggtgtga aacaggtatg tatcaactca gtgttattaa 180
taacaatact acaaatagta atataataac aataatacca attttgctg caccoagcag 240
tgtccgtagg ccaaaaacga tgcacaagca tttytactca tttaatcttc acagccatcc 300
aacaaactag gtaactactac taattaccct agtggcacag atgaggaat taaagcttaa 360
aaattttagg gggaaataga gaaaattgaa tttagtagaa ctctctatgt tctacttatt 420
tataatagaa atgatacttt gataagccgc ttgacttcag aggtgagact ccatggacat 480
gtttgagaat cagcagatca natctaaata cttctcagg agactggagt ctttttagctg 540
taagacttgt tttattgagt ggtctgtgca ggtttggggc agagctgaat tgcctatgaa 600
atagggaaaa gccagagcct tgagttaggc agcatgttgc ccttcagaca cctcctcctt 660
ctctcctgtg acatcaatta cttcctctct actgagtcac tctcatcagc atacagacat 720
gcttttagtat cctctggctt tagtagoalt tcaatttcac cttcctctcc agctactccc 780
gtttctctgt ctctcttcca ctatlgaaat tttttctcat ctatataact caaggtttat 840
tttatttaa agaattgact atgtattttg taaataatat gtatttatt ttgaaactgc 900
ttcttagata atcatattca ctgaaatgag cttctttgac aatagcactg ctctcctctga 960
caattggaaa tgtctttcaa gtgccacagt ctgccacatt ttcttatcoa ttgcagaa 1020
gtctcagagg ttaaacctgg attttgaagt ttctggcact tatgggatgt tcatgtaga 1080
tggcagctcc caatctctcc atgctotaac ctgtaccttc tggatgaaat cctctgacga 1140
catgaaactat ggaacaccaa tctcctatgc agttgataac ggcagcgaca ataccttget 1200
cttgacttat tataacggct tataccttca tgtgaaatggc agggaaaaga taacaaactg 1260
tccctcctgt aatgatggca gatgcaatca tattgcaatc acttggcaaa gtgcaaatgy 1320
catctggaaa gctatatactg atggaaat atctgacggt ggtgtggcc tctctgttgg 1380
tttgccata cctggatgt ttaacaaaaa tgagtataat tctgttggac tctagaggtg 1440
atgtcctta aatggacatc aggtttgcta gcattgttgt tctgttctc aaacaagat 1500
taacagctat ctctctcatt tctactccc tgattatcct aactgtgggt tattagaagc 1560
tttttctcta agtaagctgt ttgcctctct gtgtgagaaa tgcctttgaa gatctacatt 1620
agaactacca agaagcatgc tgaactagca gctggttgcct aaactgtctt ctaaggagat 1680
taactacttg tattttttgt ttattttaag gatgttttg trttgtaac agtatataag 1740
caggaccact gctatctatc ttttatggcc etttcaaat agatctggc trgtctcta 1800
aaaaactctt ttaataaat akcccaggag ttttagtttg aagaattgca aactaaatt 1860
cattagtgta cccaggttct cagcattgta catggcaata agctgttct atctggatac 1920
atctatagaa gtatatgcat atgacattat tttttacttt gctcattgt ttcaggtata 1980
ctaaaagaaa altaaataga caaaaatgaa ttaagatatt agaaactgac taatcattc 2040
tagaagttag tigtatgaaa ctaggatacg tataactaata aatatagcac aaaaacta 2100
aaactcaaa aaatggcgtg agatgacct tgcgaagcct caaalacaat acttattta 2160
tttattagaa attatggcc aggtacggtg gctcaagcct gtaatccag cactttgaa 2220
ggtcaggag ggtgcatcac gaggtcagga gttggagacc gccttgaca atatggtgaa 2280
gccctatctc tactaaaaac gcacagaaaa attagccagg catggtgta gatgctgta 2340
atccagcta ctacaggaggc tgagycagga gaatcgttg aaccaggag gccagatgt 2400
cgtgagcgg agggcatgcy actcagggcc aagaatgggg agngcagggt agggggcgg 2460

```

<210> 14

<211> 2601

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 240168CB1

<400> 14

```

gggttgggg ggcgcgctg gtgagggcgg ggcttagagc cagcccgcc cgcgcaggag 60
gggcccagg ccgcgctcg ccgcgctccc cgccttctcc ccgcgctcag cccgcctcg 120
gctcgtgcc ctggctctc gtgccatggt cctcctctcc ccaggagagc ggggctcgc 180
agcccgctc accgcccgt cacggggcgc tgcggggct gctactgctc tgccttggc 240
tgccaagcgg ccgtgcggcc ttgcccggc cggcggcct gctccgaact cagcgcagc 300
tgtcggcgt ggaagcagctg ctgagggagt tccgcccga actgcaagcag gagcggctc 360
agggagagct agactgtag ctgcgcgcy gcggcgccc ccaggagac tgcggggcc 420
cggcagcgg cggctacagc gcaatgctg acgcaatc ccgcaacag gactcctgg 480
cggcggctg cagcttctg cggcggcgg cggcctgag gggctggcg caatgctgg 540
cggcctgctg ctccagccg cgtctctcc tggcggctgg ggagctgcc cggcggccc 600

```

WO 01/94587

PCT/US01/18476

```

cgccccggc agccgtgctc ggttgctacc tcttcaactg cacygcgcgc ggccgcaacg 660
ctctcaagtt cgcgctgcac agcggctaca gcagctacag cctcagccgc gcgccggcag 720
ggcccgccct ggcccaaccgcg cgcgctcgcg ccggcagga aaaggatgcy cctccactta 780
gcaaggctgg gcaagatgty gttctgcatc tgcccacaga cggggtggtt ctgacgccc 840
gcgagagcac agatgaccac gccalcgtcc agtatgagtg ggcactgctg cagggygacc 900
cgtccgtgga catgaaggtg cctcaatcag gaacctgaa gctgtcccac ctacagagg 960
gaacctaac cttccagctg acogtgacgg acactgcgcy gcagagaagc tctgacaacg 1020
tgtcaatgac agtgctctgc gcagcctaet ccacagagg atgtttgcac acttgcac 1080
gctaccactt cttctgtgac gatggctgct gcattgacat caogctcgc tgcatggag 1140
tgcagcagtg tctgatggg tctgatgaag acttctgcca gaatctggc ctggaccgca 1200
agatggtaac ccacaccgca gctagtctct ccctgccaag aaccacaggy ccgagtgag 1260
atgcaggggg tgaactcctg gtygaaaagt ctgagaaagc cactgcccac aacagccac 1320
ctgcatatc aaacacagag aagaggatc atcccgctt ttggggacca gagagtcaaa 1380
tcatctctgt gatgccagat agtagttcct cagggaagaa cagaaagag gaaagtata 1440
tatttgatc aaaggtgat ggagggagag gggaacacc agccccagaa acaggtgcag 1500
tgctaccctt ggcgctgggt tggctatca ctgctctgct gcttctcatg gttgcatgcc 1560
gactacgact ggtgaacacg aaactgaaaa aagctctcc cattacatct gaggaatcgg 1620
actacatcat aatgggatg tatctatagt aatgtaatt caataccttg gggcagggac 1680
atgttttgtt talaaattat acatctatta agtctctgat attlacagct tcttttgttt 1740
ttaaattggc cagaagatc tgcfaatccc aaatctctct ttattattta tctgtaaaaa 1800
agtttctctc gagtcaataa aaattttgga aatttagaga ggaattctatg attaagat 1860
cctaaaaata taattctgat ttatgtaagc tgtcccagaa aatgaaatg tgtacttagc 1920
tgagagaaaa ttcagatctc caggaggtgg tattagatg actgtgttaa cccattacct 1980
tttagaagcc aactgttggc ccttaccat gctggactgc tataggccca gcttcccctt 2040
gtctctggcc cctttctctc cctctgaaag ctcccagtat tcttttcttt tcccctcta 2100
aacctgtttc tgaaggtgga tctcaagcaa gttcatgct tcaatcagat gttacttagg 2160
gtgggtatcc ctaaatatata aacctatgt acagatcagt aagccttagg gaaggtgag 2220
tgggtctctt ctaaatctct ctgagctgat gtcataaggg tggctgctc cttagactga 2280
cctttgggag aaaaaaaccc cagactttga attagtaaac gctctaatg ggtcatgag 2340
tgagatagga aatcaagatg gaagcagaga atctggcatc ccaaaaacta acagaaact 2400
fcttgaagcc aaagagagca aggagaacgt ttaactcttc attacatcaa atcaapacty 2460
ctccatgggtg agagcacagc aactcattta tatatatata tatagctttt gttgatgaaa 2520
aacacaactt gaagagagga cgttgatggt attcctgggt acagcttttg taaaaaatgc 2580
accatggctt tcatccaatg g 2601

```

```

<210> 15
<211> 2791
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7481107CB1

```

```

<400> 15
cttggggaag gaggaagtcc tgcaggcggg agggaaagaa gagaggaaaa atggggatgc 60
agtggaggcg gggggcaggg cgcgagaggg agaggatccc gggagcagac gaagaaagtgc 120
agcagctaaa gctctgctca gaagaggttg gggactcgca gagagaggcg tggggcctgc 180
aggggagcgc agcagctttt agcatcgatc caaacctcaa agactcgtgg cctttgctgc 240
acctcgaggg tgggaaatag acgctctctt ttgtggagag cgtatcccaa ccgagaaact 300
ggggctcttc agagctgggc cctgctctgt gcccagggcg agctctctt gctcggggc 360
tggcccttga gggcgcgaaa cggcagccct ggcggttggg gcgagaggag gaaggtacca 420
cgcgcccgag gcacacagca gcctgcagca gaggcctct cctcagctg tctcttgggg 480
gcgcccgcgc cgtctccctc ctccggggcc gctcgtccc aggaagatgg aggcggctgg 540
cyagggaccga gagccggggc cgcctctcgg agggaccaca cctccggggg ttccaggggg 600
accttgggcg ggcggggccag cctttgctcc ccggccacgg gccggcagcg cccgctctcc 660
cccgtctcagc gcttgcggcc cgcgcgcgcg gcacgcgcgc gcaaccgcgc gcgctccc 720
ggggggcgct gcgtctctct gccacaccgg cgcaccgcgg cccctctccc ccacacctcc 780
ggcccgcaac acccggtctt cctcccaacc tcccacccc tctctgccc tccctccca 840
ttctcccct cccggcaggg ggcgggaggg ggcgtggcgg gcgggggtt tgtgtgctg 900
ggaccggctc cctcgcactc cagctccgcc agaggagcc ggcccggcc gctgtccagc 960
cgctccgtgc cccgcgcgtc ctgcccgcgc gccaccgct cctggggaga cgcagccact 1020
tgcccggcat ggatactccc agggctctgc tctggcctt ctctctcctc agttttctgt 1080
gggatttccc cggtttccag caggcttcca tctcatctc ctctctctcc gccagctgy 1140
gttccaccaa ggcctatgca agccgcaagg aaggcaagat gcagcggggc ccgcgcgaca 1200
gttaccgcyg ccgggagggc caggaaaccac agcccgggcc tcaggagcga ccccggtctc 1260
agcagccggg ggcgagggag ccgcagagca ggggtccgcy cgttggctccc cacagatca 1320

```

WO 01/94587

PCT/US01/18476

```

tgcgtcaat ctacaggact tactccatcg ctgagaagct gggcatcaat gccagctttt 1380
tccagctctc caagtccggt aatcacgata ccagctttgt agacagggga ctgacagatc 1440
tctgcacac tctctcccg agacagaagt atttgttga tgtgtccatg ctctcaagaca 1500
aagaagagct ggtggcgcg gagctgcggc tcttccgcca ggccctctca ggcctctggg 1560
ggccaccagc gggcccgctc caagtgcage tcttccctg cctttgcgcc ctactctgtg 1620
acggcgagc cctggaccgc caggggcgcc cgcggcccg ctgggaagtc ttgcactgtt 1680
ggcagggect gcccaccag ccctggaagc agctgtgctt ggagctgccc gccactgggg 1740
gcgagctgga cgcgggggag gccgagggcc gggcgccggg accccagcaa cgcggcccc 1800
cggacctggg gactctgggc ttccgcccga gggctggccc tccccggag cgggccctgc 1860
tgggtgtatt caccagatcc cagggcaaga acctgttcgc agagatggcc gagcagctgg 1920
gctcggcoga ggtcggggc ccgggcccgc ggccggagg gtctgtggcc ccgctctggg 1980
ggcggccgga tgcagggct tggctgacct cgcggcgcc cggcgccgg ccgaccggct 2040
tgcaccagtc caatggcaag cggcaggea gaaagtccag gctacgctgc agcaagaagc 2100
ccctgcaagt gaactcaag gagctgggct ggaggaactg gattatcgcc cccttggagt 2160
acgagctgta tcaactggag ggtgtatgcy acttccgct gcgctgcac ctggagccca 2220
ccaaccagc catcatccag acgctatga acttccgga ccccgctcc accccgcca 2280
gctgtgctgt gccaccaaa ttgactccca tcagcattct atacatcgac gggggcaata 2340
atgtgtctca caagcagtac gaggacatgg tgggtggatc gtgcccctgc aggtagcgg 2400
gccttctccg ccgcttggc ccggaaocaa ggtgggcaaa ggtccgctt gccagggagg 2460
ctctgtctca gagaagcga agaggaagct ggcgctggg gagctgagc gtagggaac 2520
agcttggatg ttagagccgg tgggagaaag gggagcgcag acttccagc aactctaac 2580
tgcaccacca gaggaaata tggatttca caacttgcct ggacaccct gaaaaaonag 2640
caagaggaga tttctttagt tctgtttctc tctctctctc tctctctctc 2700
tctctctctc tctctctctc tatcagtggt tctgtgtaat cccatgtgtg tcatacagct 2760
cgagatataa tggccagac gccacaacct c 2791

```

<210> 16
 <211> 709
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7476245CB1

```

<400> 16
ctcgagccgc ggcgccgaac gaagccgagg ccggggcaca gccatggccc ggcggggggg 60
ggggcctcgg atgttccgca gctctctgct ctctgccctg ctgctgccc gcgctgccc 120
gctcagctgg gatctccgg agccccgag ccgagccagc aagatccgag tgcactcgg 180
aggcaacctc tgggcccacc gtcacttcat gggcaagaag agtctggagc ctctcagccc 240
atccccatgg gggacagctc cccacaacct cctgagggag cagcgaactgc agotgagtc 300
tgcctctctc ggaatctctc tgcataagaa ggccttgggc gtagcctca gcccccgc 360
acccccatcc cagtacagga ggtctctggt acaaatctg cagaatgac acaataatg 420
gggcagcaoc aacagcttgg cttagattgt gccaccagc ggaaggtgct gaatgggacc 480
ctgttctatg cccactctgg atgtaaatcc ttagctcaaa tctctgttac tcaattactg 540
tatttctctg ctgggtcacc agaaatatcg ctgatcaga cacagattat gttcctgctg 600
tatttctctg tcccctgttg nattgggtgaa taaaaccttg ctctttacat aaaaaaaaaa 660
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 709

```

<210> 17
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5819744CB1

```

<400> 17
ctggactcgg gacctatct tgtattgcca gcacagggcc ctgaaacaca agagatattg 60
ggcaagggat agccccagtg agagagagta gaaagcaagt ccagagataa agatttagaa 120
aggtctcaga ctaaaatgac tgcctcagaa tglgggacag gagaccagag ctgcagaaga 180
gtcagctggg tgytattgga ggagaccctg gaagatgacg ctgagaaga caagcttaac 240
aggagactgg ttgtctctt gcagctgctt tacaggggag tgaagccttc ctctctcgtc 300
ttagctctgg cgtgcttcc ctgctgtgca gctactctgt gctcttgggt ctagtacctt 360
catttctcat tatgttccaa caagtcaagt tgttggggag ctgagctctt acagctccat 420
gggggaagtg gagagccaaa ggtctcaact tttgtgattc ttggagatt ttatgcacc 480

```

WO 01/94587

PCT/US01/18476

tagaaatttg	agtttttct	ggtgtctct	gggactggta	ctgcataccc	agggtacccc	540
tgtttggggg	cttttccaag	cggagtttgt	gacataatg	agttatattt	ttcctctttt	600
ctggataaga	acaatacct	tgccattcag	tcaccaata	tagcatgtgy	ttatgataga	660
agaatatcct	tatgttagga	aaagaattgg	cagtctcaat	gaggcagaaa	tgtacaattt	720
agaaaacatg	tataaattac	aaacagcggg	gta			753

<210> 18
 <211> 3413
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5378618CB1

<400> 18						
cgtctgcagc	ggcgcggggt	cagagcgcgc	ggcgcggcgg	tgggggctcg	ggccccggcg	60
ggtagcggg	accgggcatg	gcgctgcgga	ggggcggctg	cggagcgcctc	gggctgctgc	120
tgcctgctct	ggcgcggcgg	tgccctgatac	cgcggagcgc	gcagtgaggg	cggtggcgcc	180
gctgccccgc	cactgtcagc	gttaccaaag	agctatcaat	ctgggtgggc	tcctccgggg	240
tggccaggat	cgtgccccgc	gacatcagct	ccctgagcct	ggtaaatggg	acgttttcag	300
aaatcaagga	cgaatgtttt	tcccactcgc	cttctctgca	gctgctattg	ctgaattcta	360
actcaatcgc	gatcctccgg	gatgatgctt	tctctggact	tttctctatt	gaatacctgt	420
tcactgaaag	gaacaaaata	gaaaccattt	caagaatgca	ctttctgggc	ctcctgtacc	480
tgactcacc	ttctttggcc	aaataaccaca	tanaagcact	accaagggat	gtcttcagtg	540
atthagactc	ctgattgaa	ctagatttga	ggggtaataa	atttgaatgt	gactgcaag	600
ccagtgctct	ataccctggt	tgaagatga	caaatccac	cgttcttgat	gtgctgggta	660
ttgtgtccac	agatgatcag	gaaagaagc	taaatgactg	gaocagctt	gactatgat	720
gocaaactac	agattttgtt	gttctcaga	ctttacccta	ccagtcggtt	tcagtgagta	780
cgttcaactc	caagaacgat	gtgtactgtg	ccatcgcca	gcccagcatg	gagaactgca	840
tgtgtctgga	gtgggaccac	attgaaatga	atttccggag	ctatgacaac	attcacagtc	900
agctcactgt	ggcctgtaag	gceattctca	tcgatgatca	ggtctttgtg	gtggtgccc	960
agctctctcg	ggcctctcac	atttcaaat	acgacgagag	ttggacaaa	tttgtcaaat	1020
tcgaagaact	agaggtctct	cgaatttcca	agcccaatga	catcgagctg	tttcagatcg	1080
acgcagagac	gtctctgttc	atcgcagaca	gctcaaggc	tggctctctc	acagttata	1140
aatggaaacg	caaaggattc	tattcttacc	agtcactgca	cagtggtgtc	agggcacggy	1200
atggcagatt	tgttgatc	gatgaaat	cgcctctcat	ctctccagc	cgtccccagg	1260
tccccatcat	cctccagtg	aataaaact	ctagaagtt	tgtccccat	ggtgacatcc	1320
ccaacatgga	ggcgtactg	gctgtgaaga	gcttccgaat	gcaaaatcc	ctctaccctt	1380
cccttaccgg	ctctcctggg	gactccccgg	tcgatgaggt	gaacagtaag	cagtttctgg	1440
agatccaagc	cttccatccc	cggggggcca	tgaocctgca	gcccctttct	tttaagata	1500
atcacactct	ggccctgggg	agtgactata	catctctcca	gatataccag	tgggataaag	1560
agaagcagct	atcaaaaag	tttaaggaga	cttaagtcca	gggcctctg	tcattccag	1620
ctgtctccac	cgacaggaga	gatttctttt	tgtcaccag	tttcaagggt	aaacaaga	1680
ttttgacaca	tataattgtt	gaotlaagtt	tgtgaaggtg	tggtygggta	aaactaagaga	1740
aatgtagcat	tagctctcac	aaaagaggac	caagaaaat	caacaacaa	actcaagcca	1800
ggctcagagc	tctgaaatta	aaaagcactg	aaatagttag	atgttttcaa	acttttagaa	1860
ctcacatttt	aatcagggat	tgcatttatt	ggctaaactg	atgacatgcc	cattctacca	1920
tttaaaaaaa	aatcttaaa	cctgtaabtt	ctgagaaaag	agtacagcat	ttactcttat	1980
catctagaaa	tgttaatagc	ttccccccg	cttttctagt	aggagaaga	caattggata	2040
agatgggaca	gaactataaa	tgaataaaaa	aaaaactttg	agccctctc	attccatttt	2100
agcaatcttt	ttggtaagaa	ctctaaagc	caaaagtctg	ctgaaaagat	ttgctgatta	2160
ttagtttaaa	aatctgttaa	cactcagcag	tgtctatttt	agtcatacca	gtttccggaa	2220
agtaatgcc	agtcttctcg	aatctctctt	aatagcagaa	ccttgggtgt	tttgttggct	2280
catatgaatc	ctgtctcag	atatgttaac	aatttagttg	ttgacattgc	ttcctctgcc	2340
acaaagacaa	tactctgggt	acacagtctt	agacccaaga	caggtctgtg	gcccaggagt	2400
gactcaagg	agttttctcc	ctttctctac	ggtcaaaag	tgaccttgg	ggtyggcaga	2460
gcagtaatgc	tgtttctgct	ctctctctgg	ctctctctgc	ttccagagcc	caccctgta	2520
gtttgtgggt	aaccagcagg	cagcccaag	actggtgctt	ttcatttcat	cttttagagg	2580
gatgaaacag	ttatttccgt	ctgatgagca	ttcgttagaa	tttttgaagt	gagattttat	2640
gaagtcaaa	gggaacttac	acagatctcg	acctgctttg	aaacctagag	gtggcccttt	2700
gaatttctgc	tgctcttccc	ctctggacaa	cttaataatt	caagtaatcg	aatccaact	2760
tccttccag	cccactgccc	ttccgccccg	cttgtgtaac	agtcctgttt	tgttgagttg	2820
ctgctattgc	actgcccagt	cagcccacac	caaatcaaaa	cccaagatac	tcagatagga	2880
agaactcttc	ctctcccagt	actttacaaa	aggaaccccc	gcccaggacc	acattggggc	2940
acgtgttggc	agtygaatac	gcctgtgcag	gctggggatc	tcaggctgat	cagtaggggc	3000
cagctttgga	gocagccaag	ctgaaatcca	cactccaggt	ctgtgctcaa	gagaccagat	3060

WO 01/94587

PCT/US01/18476

```
gggtatttc caaatgggccc tctctgggat gggcaatagg caagctcctg gggtctggtt 3120
atgtggaaga ttcttagtgg atgttccgcc tggtagctg gttctcttca gagaatataa 3180
agtgaatgcc tttaggggta gctctgaaag agaaacccaa caacttcatt cctagccatg 3240
aaagttagcac gatcaactg tactgtatg ttatgtcaa atgattatt gcaatgcaat 3300
gagtagtag atgttttgcc acaaatatga aagtgtttgt tgttctgac ttttagccat 3360
gaagattgag accaataaat agoactcaga ggaatgaaaa aaaaaaaaa agg 3413
```

【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
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/094587 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/16,
15/19, C07K 14/52, 14/575, 16/24, 16/26, C12Q 1/68,
A61K 38/19, 38/22, G01N 33/53Way, Palo Alto, CA 94303 (US). BAUGHN, Mariah, R.
[US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577
(US). DUGGAN, Brendan, M. [AU/US]; 243 Buena
Vista, #306, Sunnyvale, CA 94086 (US). LEE, Sally
[US/US]; 825 East Evelyn, #425, Sunnyvale, CA 94086
(US). HAFALIA, April [US/US]; 2227 Calle de Primavera,
Santa Clara, CA 95054 (US). POLICKY, Jennifer,
L. [US/US]; 1511 Jarvis Court, San Jose, CA 95118 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/18476

(22) International Filing Date: 6 June 2001 (06.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
50/210,233 6 June 2000 (06.06.2000) US
50/213,465 23 June 2000 (23.06.2000) US
60/249,019 14 November 2000 (14.11.2000) US(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics,
Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE
GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo
Alto, CA 94304 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, ES, FI, FR, GB, GR, GT, HA, HK,
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,
TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LAL, Preeti
[IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US).
YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale,
CA 94087 (US). HE, Ann [CN/US]; 4601 Catalina
Drive, San Jose, CA 95129 (US). NGUYEN, Dannie, B.
[US/US]; 1403 Ridgewood Drive, San Jose, CA 95118
(US). WALIA, Narinder [US/US]; 890 Davis Street #205,
San Leandro, CA 94577 (US). GANDHI, Ameena, R.
[US/US]; 837 Roble Avenue, #1, Menlo Park, CA 94025
(US). AZIMZAI, Vaidh [US/US]; 5518 Boulder Canyon
Drive, Castro Valley, CA 94552 (US). BANDMAN, Olga
[US/US]; 366 Anna Avenue, Mountain View, CA 94043
(US). TANG, Ya, Tom [US/US]; 4230 Ranwick Court, San
Jose, CA 95118 (US). LU, Yan [US/US]; 3885 Corrina(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KL, 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:
27 December 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/094587 A3

(54) Title: EXTRACELLULAR MESSENGERS

(57) Abstract: The invention provides human extracellular messengers (XMES) and polynucleotides which identify and encode XMES. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides methods for diagnosing, treating or preventing disorders associated with aberrant expression of XMES.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/18476
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/16 C12N15/19 C07K14/52 C07K14/575 C07K16/24 C07K16/26 C12Q1/68 A61K38/19 A61K38/22 G01N33/53		
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		
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, MEDLINE, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 36105 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC) 22 June 2000 (2000-06-22) SEQ ID NO:2 is identical to SEQ ID NO:1 of the present application the whole document ---	1-45,54
E	WO 02 02621 A (ZYMOGENETICS INC) 10 January 2002 (2002-01-10) SEQ ID NO:303 is identical to SEQ ID NO:1 in this application the whole document ---	1-45,54
E	WO 01 93983 A (STEPHAN JEAN PHILIPPE F ;BAKER KEVIN P ; DESNOYERS LUC) 13 December 2001 (2001-12-13) nucleotides 4-1357 in Figure 83 are 99.6% identical to nucleotides 21-1374 in SEQ ID NO:10 in the present application --- -/--	1-45,54
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 claims 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	Date of mailing of the international search report	
8 April 2002	23. 07. 2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015	Authorized officer CUPIDO, M	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18476

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAMAUCHI T ET AL: "PURIFICATION AND MOLECULAR CLONING OF PROSTACYCLIN-STIMULATING FACTOR FROM SERUM-FREE CONDITIONED MEDIUM OF HUMAN DIPLOID FIBROBLAST CELLS" BIOCHEMICAL JOURNAL, PORTLAND PRESS, LONDON, GB, vol. 303, 1994, pages 591-598, XP002945829 ISSN: 0264-6021 figure 8	1-6,9-17
A	WO 97 39123 A (GENETICS INST) 23 October 1997 (1997-10-23)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/18476
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. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Although claim 18 is directed to a method of treatment of the human/animal body, and claims 32 and 34 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	20,21,23,24
	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
	see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
	1-44 (partially); 45, 54 (complete)
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US 01/18476

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims Nos.: 20,21,23,24

Claims 20, 21, 23 and 24 refer to an agonist and antagonist of the polypeptide of claim 1 without giving a true technical characterisation. Moreover, no such compounds are defined in the application. Consequently, the scope of these claims is ambiguous and vague. No meaningful search can be carried out for such claims whose wording is in fact a mere recitation of the results to be achieved.

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 Application No. PCT/US 01/18476

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-44 (all partly), 45 and 54

Polypeptide comprising an amino sequence at least 90% identical to SEQ ID NO:1, biologically active or immunogenic fragments thereof, polynucleotides encoding them, cells and transgenic organism containing said polynucleotides and their use to produce the encoded peptides, antibodies binding thereto, diagnostic and therapeutic uses thereof.

2. Claims: 1-44 (all partly), 46 and 55

As above relating to SEQ ID NO:2

3. Claims: 1-44 (all partly), 47 and 56

As above relating to SEQ ID NO:3

4. Claims: 1-44 (all partly), 48 and 57

As above relating to SEQ ID NO:4

5. Claims: 1-44 (all partly), 49 and 58

As above relating to SEQ ID NO:5

6. Claims: 1-44 (all partly), 50 and 59

As above relating to SEQ ID NO:6

7. Claims: 1-44 (all partly), 51 and 60

As above relating to SEQ ID NO:7

8. Claims: 1-44 (all partly), 52 and 61

As above relating to SEQ ID NO:8

9. Claims: 1-44 (all partly), 53 and 62

As above relating to SEQ ID NO:9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/18476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0036105	A	22-06-2000	AU 2055400 A	03-07-2000
			EP 1151101 A1	07-11-2001
			WO 0036105 A1	22-06-2000
WO 0202621	A	10-01-2002	AU 7158901 A	14-01-2002
			AU 7168301 A	14-01-2002
			AU 7174401 A	14-01-2002
			AU 7178601 A	14-01-2002
			AU 7316401 A	14-01-2002
			WO 0202621 A2	10-01-2002
			WO 0202626 A2	10-01-2002
			WO 0202604 A2	10-01-2002
			WO 0202627 A2	10-01-2002
			WO 0202636 A2	10-01-2002
			US 2002039763 A1	04-04-2002
			US 2002086367 A1	04-07-2002
			US 2002076779 A1	20-06-2002
WO 0193983	A	13-12-2001	US 2002052027 A1	02-05-2002
			AU 2055401 A	12-06-2001
			AU 2590901 A	03-07-2001
			AU 5460100 A	18-12-2000
			AU 6501901 A	11-12-2001
			AU 6531101 A	17-12-2001
			AU 6802801 A	24-09-2001
			WO 0140466 A2	07-06-2001
			WO 0146420 A2	28-06-2001
			WO 0168848 A2	20-09-2001
			WO 0192331 A2	06-12-2001
			WO 0193983 A1	13-12-2001
			US 2002090681 A1	11-07-2002
			US 2002072496 A1	13-06-2002
			US 2002072067 A1	13-06-2002
			US 2002072092 A1	13-06-2002
			US 2002072497 A1	13-06-2002
			AU 3434601 A	12-06-2001
			AU 5516801 A	17-09-2001
			AU 7079300 A	25-03-2001
			AU 7573000 A	25-03-2001
			EP 1208201 A2	29-05-2002
			EP 1208202 A2	29-05-2002
			WO 0116318 A2	08-03-2001
			WO 0116319 A2	08-03-2001
			WO 0140465 A2	07-06-2001
			WO 0166740 A2	13-09-2001
			AU 7197301 A	05-02-2002
			AU 7315001 A	30-01-2002
			AU 7885201 A	08-01-2002
			WO 0200690 A2	03-01-2002
			WO 0208288 A2	31-01-2002
			WO 0208284 A2	31-01-2002
AU 1916701 A	16-07-2001			
AU 6391000 A	19-02-2001			
AU 6901800 A	12-06-2001			
WO 0140464 A1	07-06-2001			
WO 0149715 A2	12-07-2001			
US 2002058309 A1	16-05-2002			
AU 6810801 A	04-03-2002			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/18476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0193983	A	AU 7011801 A	04-03-2002	
		AU 8490601 A	04-03-2002	
		AU 8678501 A	04-03-2002	
		WO 0216611 A2	28-02-2002	
		WO 0216429 A2	28-02-2002	
		WO 0216581 A2	28-02-2002	
		WO 0216602 A2	28-02-2002	
		AU 7884201 A	08-01-2002	
		WO 0224888 A2	28-03-2002	
		AU 6871401 A	08-01-2002	
WO 9739123	A	23-10-1997	AU 2732997 A	07-11-1997
			AU 2734497 A	07-11-1997
			AU 2801697 A	07-11-1997
			EP 0914336 A2	12-05-1999
			EP 0914337 A2	12-05-1999
			EP 0912731 A2	06-05-1999
			JP 2001509004 T	10-07-2001
			JP 2001510323 T	31-07-2001
			JP 2002502234 T	22-01-2002
			US 2001016650 A1	23-08-2001
			WO 9739123 A2	23-10-1997
			WO 9739102 A2	23-10-1997
			WO 9739030 A2	23-10-1997
			US 6280739 B1	28-08-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00	C 0 7 K 1/22	4 C 0 8 5
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	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 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(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, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72) 発明者 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 8 7 ・ サニーベイル・ルイスアベニュー 8 2 6
- (72) 発明者 ヒー、アン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 9 ・ サンノゼ・カタリナドライブ 4 6 0 1
- (72) 発明者 ニュエン、ダニエル・ビー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ・リッジウッドドライブ 1 4 0 3
- (72) 発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ ユニオンシティ・# 7 1 2 ・ ユニオンスクエア 3 3
- (72) 発明者 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 2 5 ・ メンロパーク・# 1 ・ ローブルアベニュー 8 3 7
- (72) 発明者 アジムザイ、ヤルダ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 2 ・ カストロバレー・ボールダーキャニオンドライブ 5 5 1 8
- (72) 発明者 バンドマン、オルガ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 0 4 3 ・ マウンテンビュー・アンナアベニュー 3 6 6
- (72) 発明者 タング、ワイ・トム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 1 8 ・ サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0
- (72) 発明者 リュ、ヤン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 3 ・ パロアルト・コリーナウェイ 3 8 8 5
- (72) 発明者 ボーグン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 7 7 ・ サンレアンドロ・サンティアゴロード 1 4 2 4 4

- (72)発明者 ダガン、ブレンダン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 6・サニーベイル・# 3 0 6・ブエナビスタ 2 4 3
- (72)発明者 リー、サリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 6・サニーベイル・# 4 2 5・イーストイーブリン 8
2 5
- (72)発明者 ハファリア、エープリル
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 5 4・サンタクララ・コーレデプリマベータ 2 2 2 7
- (72)発明者 ポリッキー、ジェニファー・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・ジャービスコート 1 5 1 1
- F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA14 BB03 BB20 BB24 CB01 DA12 DA13 DA14
DA36 DA37 DA77 FA16 FB02 FB03 FB07 FB13
4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA03 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20
DA02 DA06 EA02 EA04 FA02 GA03 GA11 HA03 HA11 HA13
HA14
4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53 QQ61
QQ79 QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QR74
QR77 QR80 QR84 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02
4B064 AG01 AG27 CA01 CA02 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 CE12
DA01 DA13
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X AA91X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02
BA08 BC01 BD14 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 NA14
ZB11 ZB26
4C085 AA13 BB11 DD26 EE01 KA03 LL18
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
EA50 FA71 FA72 FA74 GA26

專利名称(译)	細胞外信使		
公开(公告)号	JP2004515216A	公开(公告)日	2004-05-27
申請号	JP2002502128	申請日	2001-06-06
[标]申請(專利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申請(專利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]發明人	ラルプリーティ ユエヘンリー ヒーアン ニュエンダニエルビー チョーラナリンダーケイ ガンディーアミーナール アジムザイヤルダ バンドマンオルガ タングワイトム リュヤン ボーグンマライアール ダガンブレンダンエム リーサリー ハファリアエープリル ポリッキージェニファーエル		
發明人	ラル、プリーティ ユエ、ヘンリー ヒー、アン ニュエン、ダニエル・ビー チョーラ、ナリンダー・ケイ ガンディー、アミーナ・アール アジムザイ、ヤルダ バンドマン、オルガ タング、ワイトム リュ、ヤン ボーグン、マライア・アール ダガン、ブレンダン・エム リー、サリー ハファリア、エープリル ポリッキー、ジェニファー・エル		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61K49/00 A61P29/00 A61P35/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/16 C12N15/19 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P29/00 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.Z A61K45/00 A61K49/00.Z A61P29/00 A61P35/00 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB13 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06		

4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BC01 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/DD26 4C085/EE01 4C085/KA03 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26

優先権
60/210233 2000-06-06 US
60/213465 2000-06-23 US
60/249019 2000-11-14 US

外部リンク Espacenet

摘要(译)

本发明提供了识别和编码XMES的人细胞外信使 (XMES) 和多核苷酸。本发明还提供了表达载体, 宿主细胞, 抗体, 激动剂和拮抗剂。本发明还提供了用于诊断, 治疗或预防与XMES的异常表达相关的病症的方法。

		特許庁登録簿 (P2004-515216A)	
		(43) 公表日 平成16年5月27日 (2004.5.27)	
(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/00	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	Z	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 45/00		4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 49/00	Z	4 B 0 6 4
A 6 1 K 49/00	A 6 1 P 29/00		4 B 0 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 224 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2002-502128 (P2002-502128)	(71) 出願人	301005050
(22) 出願日	平成13年6月6日 (2001.6.6)		インサイト・ゲノミクス・インコーポレイテッド
(23) 優先権主張番号	60/210,233		アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ボートドライブ 3160
(24) 優先日	平成12年6月6日 (2000.6.6)	(74) 代理人	100089266
(25) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 大島 陽一
(26) 優先権主張番号	60/213,465	(72) 発明者	ラル、ブリーティ
(27) 優先日	平成12年6月23日 (2000.6.23)		アメリカ合衆国カリフォルニア州95056・サンタクララ・ビーオーボックス 5142
(28) 優先権主張国	米国 (US)		
(29) 優先権主張番号	60/249,019		
(30) 優先日	平成12年11月14日 (2000.11.14)		
(31) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く