

(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2004-514411**(P2004-514411A)**(43) 公表日 **平成16年5月20日(2004.5.20)**

(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	45/00		4 B O 2 4
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P	3/08		4 B O 6 3
A 6 1 P	3/08	A 6 1 P	3/10		4 B O 6 4
A 6 1 P	3/10	A 6 1 P	5/00		4 B O 6 5
		審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 228 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2001-586959 (P2001-586959)	(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5月17日 (2001.5.17)	(74) 代理人	100089266		
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月15日 (2002.11.15)		弁理士 大島 陽一		
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/016283	(72) 発明者	サンジャンワラ、マデュー・エス		
(87) 国際公開番号	W02001/090148		アメリカ合衆国カリフォルニア州94024・ロスアルトス・シルビアコート 210	最終頁に続く	
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001.11.29)				
(31) 優先権主張番号	60/205,518				
(32) 優先日	平成12年5月19日 (2000.5.19)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(31) 優先権主張番号	60/213,956				
(32) 優先日	平成12年6月22日 (2000.6.22)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(31) 優先権主張番号	60/215,105				
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				

(54) 【発明の名称】 神経伝達物質トランスポーター

(57) 【要約】

本発明はヒト神経伝達物質トランスポーター (N T T) および N T T 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、N T T 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) からなる群から選択した単離されたポリペプチド。

(a) SEQ ID NO: 1 - 6 (配列番号 1 乃至 6) からな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 - 6 からな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含む天然のポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 1 - 6 からな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 - 6 からな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 - 6 からな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: 7 - 12 (配列番号 7 乃至 12) からな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、以下の過程を含む方法。 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過程と、

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 11】

以下の (a) 乃至 (d) からな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: 7 - 12 からな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 40

(b) SEQ ID NO: 7 - 12 からな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ポリヌクレオチドを含む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含む少なくとも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(ただし、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)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を含む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。 10

【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含む組成物。 20

【請求項17】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する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NTT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含む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、 30

(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過程と、

(b) 前記サンプルにおいてアゴニスト活性を検出する過程を含むことを特徴とする方法。

【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組成物。

【請求項21】

機能的なNTT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20の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【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、 40

(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過程と、

(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過程を含むことを特徴とする方法。

【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る賦形剤とを含む組成物。

【請求項24】

機能的なNTTの過剰な発現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 50

が必要な患者に請求項 2 3 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。

【請求項 2 5】

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ステップと、

(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ステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

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、

(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 2 7】

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過程と、

(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、

(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 2 8】

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 1 1 のポリヌクレオチドの少なくとも 2 0 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 1 1 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、

(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 2 9】

生物学的サンプル中の N T T 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 1 0 に記載の抗体と結合する過程と、

(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 3 0】

10

20

30

40

50

前記抗体が、

- (a) キメラ抗体
- (b) 単鎖抗体
- (c) F a b 断片
- (d) F (a b ')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 1 0 に記載の抗体。

【請求項 3 1】

請求項 1 0 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 3 2】

被検者の N T T 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 3 1 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。 10

【請求項 3 3】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項 3 1 に記載の化合物。

【請求項 3 4】

被検者の N T T 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 3 3 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 3 5】

請求項 1 0 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、S E Q I D N O : 1 - 6 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、 20

(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、S E Q I D N O : 1 - 6 からな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 3 6】

請求項 3 5 に記載の方法で産出した抗体。

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項 3 8】

請求項 1 0 に記載の抗体の特異性を有する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、S E Q I D N O : 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する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、 30

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

(c) 前記抗体産出細胞を不死化の細胞と融合して、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) S E Q I D N O : 1 - 6 からな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モノクローナル抗体を前記培養物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 3 9】

請求項 3 8 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【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 50

とする請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 43】

SEQ ID NO: 1 - 6 からな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 10 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO: 1 - 6 からな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。

10

【請求項 44】

SEQ ID NO: 1 - 6 からな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 10 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、SEQ ID NO: 1 - 6 からな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。

【請求項 45】

SEQ ID NO: 1 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 46】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 47】

SEQ ID NO: 3 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 48】

SEQ ID NO: 4 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 49】

SEQ ID NO: 5 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 50】

SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 51】

SEQ ID NO: 7 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。

30

【請求項 52】

SEQ ID NO: 8 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 53】

SEQ ID NO: 9 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 54】

SEQ ID NO: 10 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。

40

【請求項 55】

SEQ ID NO: 11 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 56】

SEQ ID NO: 12 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)

50

本発明は、神経伝達物質トランスポータ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、輸送に関した疾患と神経医学および精神医学上の疾患の診断・治療・予防および同じくこれらの配列を利用した神経伝達物質トランスポータ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効果についての評価に関する。

【0002】

(発明の背景)

ヒトの神経系は全ての身体機能を調節しているが、このヒトの神経系は脳と脊髄からなる中枢神経系(CNS)および神経インパルスを感じ覚器官からCNSに伝導する求心性神経経路と運動インパルスをCNSから効果器官に伝導する遠心性神経経路からなる末梢神経系(PNS)からなっている。PNAはさらに骨格筋のような随意運動を調節する体性神経系と、心臓、肺および内蔵の不随意運動を調節する自律神経系に分けることができる。

10

【0003】

中枢神経系(CNS)は、脊髄レベル、下位脳レベルおよび上位脳レベルすなわち皮質レベルにある1兆以上のニューロンからなっている。

ニューロンは細胞間で電氣的または化学的なシグナルを送る。脊髄、すなわち骨質の脊柱管の中の細い管として存在する中枢神経系の延長部分、は上行感覚経路と下行運動経路を含み、脳幹および大脳半球の膜につながった膜で覆われている。脊髄は胴体および手足の運動出力および感覚入力系の殆ど全てを含み、脊髄内のニューロン回路は歩行等の律動的な動きおよびさまざまな反射も制御している。延髄、脳橋、中脳、小脳、基底核、黒質、視床下部および視床等の脳の下位領域は動脈圧および呼吸、平衡および唾液分泌等の摂食反射を含む無意識の活動を制御する。

20

怒り、興奮、性的反応および痛みまたは快感への反応は下位脳に由来する。大脳皮質、すなわち上位脳は最大の構造であり、脳梁で連結された左右の半球からなっている。大脳皮質は知覚、随意筋骨格運動、および意識、言語、感情および記憶に関連する広範囲の活動に関係する統合機能、感覚および運動機能にかかわっている。大脳は神経系の下位センターと共同して機能する。

【0004】

神経細胞(ニューロン)は細胞体、軸索、樹状突起および軸索終末という4つの領域を含んでいる。細胞体は、核その他の細胞小器官を含んでいる。樹状突起は細胞体から外方向に伸びる突起であり、感覚器官または他のニューロンの軸索からのシグナルを受け取る。これらのシグナルは電気インパルスに変換され、細胞体に伝送される。軸索(そのサイズは1ミリから1メートル以上まで広範囲に及ぶ)は細胞体からの神経インパルスを外へ伝導する単一の突起である。微小管および神経フィラメントを含む細胞骨格繊維は軸索の全長にわたって走り、タンパク質、膜小胞その他の高分子を細胞体から軸索に沿って軸索終末まで輸送する機能を持っている。一部の軸索は、希突起膠細胞(CNS)またはシュワン細胞(PNS)の膜でできた髄鞘によって覆われている。有髄軸索は同じ直径の無髄軸索に比べて電気インパルスを速く伝導する。軸索終末は軸索の細胞体と離れた側の先端にある(Lodish, H. 他(1986) Molecular Cell Biology Scientific American Books New York NY, 715-719ページを参照)。

30

40

【0005】

CNS関連のタンパク質は、ニューロンシグナルの伝達、細胞接着、神経再生、軸索誘導、神経発生その他の機能において役割を持っている。CNS関連タンパク質の中には膜に埋め込まれた部分を形成していたり、膜に結合しているものがある。例えば、神経膜タンパク質35(NMP35)は神経膜に緊密に関連し、ラット成体の神経系で高度に発現していることが知られている(Schweitzer, B. 他(1998) Mol. Cell. Neurosci. 11:260273)。シナプトフィジン(SY)は小型シナプス小胞の主要な膜内在性タンパク質である。ヒトとマウスにおけるSYの染色体位置はX染色体のサブバンドXp11.22-p11.23である。この領域はWiskott-Aldrich症候群、3種類のX遺伝子連関の高カルシウム尿腎結石症、そして

50

色素性網膜炎2、先天性停止性夜盲症およびAl land Island眼病等の眼疾患を含むいくつかの遺伝病に関与しているとされている(Fisher, S. E. 他(1997) Genomics 45:340-347)。ペリフェリン、すなわち網膜緩慢性タンパク質(rds)は光受容体の外側セグメントディスクの周縁に存在する膜内在性の糖タンパク質である。哺乳動物においては、rdsは関係する非糖タンパク質との異好性相互作用を通じてディスク周縁を安定化すると考えられている。rdsは杵体および錐体光受容体の異常な発達とその後のゆっくりとした変性を特徴とするマウスの神経学的突然変異である(Kedzierski, W. J. 他(1999) Neurochem. 72:430438)。

【0006】

43 KD 後シナプスタンパク質、すなわちアセチルコリン受容体関連43 KDタンパク質(RAPSYN)はシナプス部位においてニコチン性アセチルコリン受容体のつなぎ留めあるいは安定化に役割を果たしていると考えられている。RAPSYNは膜結合にかかわっており、アセチルコリン受容体を、裏打ちする後シナプス細胞骨格にリンクしている可能性がある(Buckel, A. 他(1996) Genomics 35:613-616)。Neuritinはタンパク質であり、その遺伝子は神経活動によって、及び神経発生を推進する神経栄養因子(neurotrophin)によって誘導されることが知られている。Neuraxinはラット中枢神経系の構造タンパク質であり、免疫学的に微小管関連タンパク質5(MAP5)と関係していると考えられている。Neuraxinは新しいタイプのニューロン特異的タンパク質であり、12個のセントラル・ヘプタデカリピート(heptadecarepeats)と推定上のタンパク質及び膜相互作用部位という異例のアミノ酸組成を特徴とする。neuraxinをコードする遺伝子は半数体ラット・ゲノム内で唯一独自であり、高等脊椎動物で保存されている。neuraxinは神経膜・微小管相互作用に関与しているとされており、齧歯類の中枢神経系(CNS)全体を通じて発現している(Rienitz, A. 他(1989) EMBO J. 8:28792888)。

【0007】

NudCは核運動タンパク質であり、神経移動にかかわる脳回欠損遺伝子産物Lis1と相互作用する。MillerDieker症候群(MDS)または分離した脳回欠損配列(ILS)を持つ人々はLIS1遺伝子の中に単価接合体の欠失または突然変異が起こっている。いずれの状態も脳の表面が滑らかで、皮質が厚くて4つの異常な層があり、ニューロンの場所が間違っているという特徴を持っている。LIS1は脳室ゾーン及び皮質プレートで高度に発現している。Lis1とNudCの相互作用とMDSおよびILSの表現型を考え合わせると、脳室ゾーン内の核運動が神経の運命と皮質の構造に密接に関係しているという可能性が出てくる(Morris, S. M. 他(1998) Curr. Biol. 8:603606)。

【0008】

CNS関連タンパク質はホスホプロテインでもありうる。例えば、ARPP21(サイクリックAMP調節性ホスホプロテイン)は線条体その他脳のドーパミンを受容する(dopaminocceptive)領域に非常に豊富に存在する細胞質性神経ホスホプロテインである。ARPP21 mRNAの定常状態は発達に関連して調節されている。しかし、新生および成熟した動物においては、ARPP21 mRNAは黒質の6ヒドロキシドーパミン病変の後でも、あるいはD1またはD2ドーパミン受容体を増加調節する薬理的治療によっても変異しない(Ehrlich, M. E. 他(1991) Neurochem. 57:1985-1991)。

【0009】

CNS関連シグナル伝達タンパク質はPDZドメインを含むことがある。PDZドメインは、細胞膜表面におけるシグナル伝達イベントに関わっている多機能タンパク質複合体のアセンブリのアダプタの役割をするタンパク質の中で見つかった。PDZドメインは、いくつかのジストロフィン関連タンパク質および神経一酸化窒素シンターゼ(NOS)

10

20

30

40

50

を含む膜関連タンパク質の中で一般にみられる (Ponting, C. P. 他 (1997) Bioessays 19: 469 - 479)。

【0010】

CNS関連タンパク質は上皮成長因子 (EGF) ドメインを含むことがある。Notchタンパク質は反復EGFドメインの細胞外領域を含む膜貫通タンパク質である。Notchタンパク質 (例えばショウジョバエ (*Drosophila melanogaster*) の神経性タンパク質Notch) は一般に発達過程の阻止に関わっている。Notchファミリーのその他のメンバーは *Caenorhabditis elegans* の *lin12* および *glp1* 遺伝子である。遺伝学的研究の示すところによると、*lin12* および *glp1* タンパク質が、特定の発達の細胞相互作用における受容体として機能している。その細胞相互作用は、ある種の胚欠陥に関わっている可能性がある (Tax, F. E. 他 (1994) Nature 368: 150154)。Pecanex (*D. melanogaster* の母性効果神経性遺伝子座) は大きな膜貫通タンパク質をコードしていると考えられている。pecanex遺伝子の母性発現がない場合、胚はNotch突然変異胚の特徴である過剰神経化に似た重度の過剰神経化を発症する (LaBonnie, S. G. 他 (1989) Dev. Biol. 136: 1116)。他のCNS関連シグナル伝達タンパク質はWWドメインを含んでいる。WWドメインは2つの高度に保存されたトリプトファンを持ったタンパク質モチーフである。このドメインはHuntingtin相互作用タンパク質を含む数々のシグナル伝達及び調節タンパク質に存在している。いくつかの繊維芽細胞成長因子 (FGF) 相同因子 (すなわちFHFポリペプチド) も、マウスおよびヒト組織におけるmRNA発現パターンからみて、神経系発達に関与しているとされている。FHFファミリーのポリペプチドのメンバーは構造的にプロトタイプのFGFと区別可能であるが、このことはFGF関係タンパク質の異例な役割と整合している (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 9850 - 9857 and Hartung, H. 他 (1997) Mech. Dev. 64: 31 - 39)。

【0011】

アルツハイマー病 (AD) はCNSの変性疾患であり、成人の中期から後期において漸進的な記憶の喪失と認知の衰退をもたらす。ADはアミロイド沈着および神経内の神経原線維錯綜を含む広範囲の神経病理学的特徴を持っている。神経変性及びADに至る発病経路はよくわかっていないが、この病気にかかりやすくする遺伝子座が少なくとも3つ特定されている (Schellenberg, G. D. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 8552 - 8559; Sherrington, R. 他 (1995) Nature 375: 754 - 760)。

【0012】

Neuronal Thread Proteins (NTP) は脳及び神経管外胚葉腫瘍細胞株に見られる免疫学的に関係のある分子のグループである。神経細胞におけるNTPの発現は、増殖、分化、脳の発達、アルツハイマー病 (AD) の脳、及び再生神経発芽に関連する病理学的状態において増加する (de la Monte, S. M. 他 (1996) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55: 1038 - 1050)。末期AD脳ライブラリから単離された組換えNTP (AD7c - NTP) に対して生成されたモノクローナル抗体は、AD脳組織の白質、神経網繊維および周核体において高レベルのNTP免疫活性を示した。in vitroの研究により、NTPの増加調節、リン酸化および周核体から細胞突起および成長円錐への転座が、成長因子に誘導された神経突起発芽および神経分化中に起こることも示された。さらに、NTPの免疫反応性の増加がダウン症候群の脳で10 ~ 20歳の年齢において、広範囲のAD神経変性が確立する前に、そして対照の脳でNTP発現が低レベルまたは不在である年齢において始まることを見出された。これらの知見は、脳内のNTPの異常な発現と蓄積がダウン症候群のAD神経変性の早期マーカーでありえることを示している (de la Monte, S. M. 他 (1996) J. Neurol. Sci. 135: 118 - 125)。

。さらに、A D 脳組織における N T P の発現及び蓄積の増加と対応して脳脊髄液 (C S F) における N T P の増加が平行して起こり、C S F 内の N T P の増加はこの病気の早期に検出可能である。

【 0 0 1 3 】

星状細胞腫およびさらに悪性のグリア芽細胞腫は脳における最も一般的な原発腫瘍であり、原発脳腫瘍の 6 5 % 以上を占めている。これらの腫瘍は星状細胞系統のグリア細胞で生じる。病原体の感染の後、星状細胞は抗原提示細胞として機能し、リンパ球及びマクロファージの活動を調節する。星状細胞は、通常なら病原体の感染の後でのみ生成されるサイトカインおよびインターロイキンを構成的に発現する (d e M i c c o , C . (1 9 8 9) J . N e u r o i m m u n o l . 2 5 : 9 3 - 1 0 8) 。星状細胞の分化に関係する遺伝子を特定する過程で、植物病原関係 (P R) タンパク質に構造的に関係しているタンパク質をコードする一つの c D N A が星状細胞 c D N A ライブラリから単離された (M u r p h y , E . V . 他 (1 9 9 5) G e n e 1 5 9 : 1 3 1 - 1 3 5) 。神経膠腫病原関係タンパク質 (G l i P R) はグリア芽細胞腫において高度に発現しているが、胎児や成人の脳あるいはその他の神経系腫瘍においてはそうではない。P R タンパク質はタバコモザイクウイルス等の植物のウイルス感染によって誘導される小さな (1 0 ~ 2 0 k D a) のプロテアーゼ耐性タンパク質のファミリーである。P R タンパク質の合成は植物における原始的な免疫反応の一部であると考えられている (v a n L o o n , L . C . (1 9 8 5) P l a n t M o l . B i o l . 4 : 1 1 1 - 1 1 6) 。G l i P R は、タンパク質の殆ど 3 分の 2 を構成する領域にわたって P R - 1 タンパク質ファミリーと最大 5 0 % の相同性を示し、その中には金属結合ドメインを形成するように適切な間隔で配置されたアミノ酸の三つ組 H i s - G l u - H i s が含まれている (M u r p h y 他、前出) 。

F e 6 5 タンパク質ファミリーの新しいメンバーである F e 6 5 様タンパク質 (F e 6 5 L 2) は、アルツハイマー・ベータアミロイド前駆体タンパク質 (A P P) の細胞質ドメインと相互作用するリガンドの一つである。A P P を発現している遺伝子組換えマウスはアルツハイマー病の顕著な行動及び病理学的な特徴の一部を模倣することが知られているが、その中には年齢に関係した学習及び記憶機能障害、神経損失、グリオーシス、神経炎的变化、アミロイド沈着及び異常な t a u リン酸化が含まれる。A P P の細胞質ドメインと相互作用するタンパク質は、A P P の生理学的機能に対する新しい洞察を与え、ひいてはアルツハイマー病の病原に対する洞察も与えてくれる (D u i l l i o , A . 他 (1 9 9 8) B i o c h e m . J . 3 3 0 : 5 1 3 - 5 1 9) 。

【 0 0 1 4 】

一つのニューロンともう一つのニューロンとの間の接触はシナプスと呼ばれる専門化した部位で起こる。この部位において、一つのニューロン (シナプス前細胞) からの軸索終末がもう一つのニューロン (シナプス後細胞) にシグナルを送る。シナプスは電氣的または化学的に接続しうる。電氣的シナプスは 2 つのニューロンを接続するギャップ結合からなり、シナプス前細胞からシナプス後細胞に電気インパルスを直接通す。化学的シナプスにおいては、シナプス前細胞の軸索終末が特定の神経伝達物質分子を含む膜小胞を含んでいる。神経終末における電位の変化の結果、電圧依存性チャネルを通じてカルシウムイオンが流れ込み、これにトリガされてシナプス小胞からエキソサイトーシスによって神経伝達物質が放出される。神経伝達物質はシナプス前神経細胞とシナプス後細胞を分離しているシナプス間隙を急速な拡散によって横断する。神経伝達物質は受容体に結合し、シナプス後細胞の原形質膜にある伝達物質依存性イオンチャネルを開き、細胞内の電位の変化を誘発する。このシナプス後細胞の膜電位の変化により、神経インパルスのその後の伝達が興奮または抑制されうる。シナプス前カルシウムチャネルの活動はシステイン・ストリングタンパク質 (C S P) によって調節される。C S P は神経伝達だけでなくその他の細胞種のエキソサイトーシスにおいても機能する分泌性小胞タンパク質である。カルシウムレベルに対する C S P の効果はカルシウム放出に後続すると思われており、またエキソサイトーシスが関わっていると思われ、おそらく G タンパク質とも関連してると考えられる (M

agga, J. M. 他 (2000) Neuron 28:195-204; Dawson-Scully, K. 他 (2000) J. Neurosci. 20:6039-6047; Chamberlain, L. H. 他 (2001) J. Cell Sci. 114:445-455)。

【0015】

神経伝達物質は、アセチルコリン、モノアミン（セロトニン、ドーパミン、ヒスタミン等）、アミノ酸（ガンマアミノ酪酸（GABA）、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩等）、および神経ペプチド（エンドルフィンおよびエンケファリン等）を含む30ほどの小さな分子からなる多様なグループを含んでいる（McCance, K. L. and Huether, S. E. (1994) PATHOLOGY, The Biologic Basis for Disease in Adults and Children, 第二版, Mosby, St. Louis, MO, 403-404ページ）。これらの分子の多くは2つ以上の機能を持ち、その効果は興奮性（例えばシナプス後細胞の原形質膜を脱分極化して神経インパルスの伝達を刺激）あるいは抑制性（例えば原形質膜を過分極化して神経インパルスの伝達を抑制）である。

【0016】

神経伝達物質およびその受容体は神経機能の制御を目的とする薬物の標的である。例えば、GABAはCNSにおける主要な抑制性神経伝達物質であり、GABA受容体はGABA仲介性効果を強化することにより作用するベンゾジアゼピンおよびバルビツール酸塩等の鎮静剤の主要な標的である（Katzung, B. G. (1995) Basic and Clinical Pharmacology, 第六版, Appleton & Lange, Norwalk, CT, 338-339ページ）。

2つの主要なクラスの神経伝達物質トランスポーターが神経系の機能に必須である。第一のクラスはニューロンとグリア細胞の原形質膜内の取り込みキャリアであり、細胞外の空間から細胞に神経伝達物質を輸送する。この過程は原形質膜の両側の Na^+ 勾配に依存し、 Na^+ の共役輸送では特にそうである。2つのタンパク質ファミリーが特定されている。第一のファミリーはグリシン、プロリン等のアミノ酸、ノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニン等のモノアミンおよびGABAのトランスポーターを含む。共通な構造部分としては12個の推定膜貫通型 α ヘリックスドメイン、細胞質N-およびC-末端、および膜貫通型ドメインを3~4つに分けている大きなグリコシル化細胞外ループが挙げられる。この相同タンパク質のファミリーは Na^+ および Cl^- イオンと神経伝達物質の細胞内への共役輸送からエネルギーを引き出している（ Na^+/Cl^- 神経伝達物質トランスポーター）。第2のファミリーはグルタミン酸塩等の興奮性アミノ酸のトランスポーターを含んでいる。共通の構造部分としては、推定6~10個の膜貫通型ドメイン、細胞質N-およびC-末端、および細胞外ループのグリコシル化が含まれる。興奮性アミノ酸トランスポーターは Cl^- に依存せず、細胞内 K^+ イオンを必要とする可能性がある（ Na^+/K^+ 神経伝達物質トランスポーター）（Liu, Y. 他 (1999) Trends Cell Biol. 9:356-363）。

【0017】

神経伝達物質トランスポーターの第2のクラスは小胞体膜内に存在し、シナプス伝達中の小胞体内容物のエキソサイトーシスの前に神経伝達物質を細胞質から小胞体に濃縮する。小胞体輸送においては、 H^+ ATPaseによって生成される小胞体膜両側の電気化学的勾配を使用する。神経伝達物質の小胞体への輸送には、2つのタンパク質ファミリーが関わっている。1つのファミリーは主にプロトン交換を使って分泌性小胞体内への輸送を駆動するが、これにはモノアミンとアセチルコリンのトランスポーターが含まれる。例えば、モノアミン・トランスポーターは細胞質伝達物質の各分子につき2つの小胞体内のプロトンを交換する。第2のファミリーはGABAトランスポーターを含むが、これはシナプス小胞体の正電荷に依存する。これら2つのクラスの小胞体トランスポーターは互いに配列の類似性がなく、その構造は原形質膜キャリアのそれとは別個である（Schloss, P. 他 (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:595-599; Liu, 50

Y. 他 (1999) Trends Cell Biol. 9:356-363)。

【0018】

GABAは支配的な抑制性神経伝達物質であり、哺乳動物の神経系に広範に分布している。GABAは特異的な高親和性の Na^+ および Cl^- 依存性のトランスポータによってシナプス間隙から除去されるが、これらのトランスポータはシナプス前およびシナプス後ニューロンと周囲のグリア細胞に局在していると考えられている。少なくとも4つのGABAトランスポータ(GAT1~GAT4)がクローン化されている(Liu, Q. R. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268:21062-112)。培養細胞およびさまざまな組織から単離された原形質膜小胞体への $[^3\text{H}]$ GABAの取り込みの研究によると、GABAトランスポータの異質性にはかなりの違いがある。基質親和性および特異性、特有のプロッカー薬理剤、およびさまざまな組織局在性の点でGABAトランスポータはさまざまな違いを示す。例えば、発現したGAT1およびGAT4のGABA取り込みの K_m 値はそれぞれ6、79、18および $0.8\mu\text{M}$ である。GAT2はGABAを輸送するだけでなく、ペプチンも輸送する。GAT3とGAT4は β アラニンとタウリンも輸送する。薬理学的な研究によると、GAT1とGAT4によるGABA輸送はGAT2とGAT3によるものと比べて2,4ジアミノ酪酸とguavicineへの感受性が高い。in situハイブリッド形成の示すところによると、GAT1とGAT4の発現は脳に特異的である。GAT2とGAT3のmRNAは肝臓、腎臓等の組織で検出されている(Schloss, P. 他 (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:595-599; Borden, L.A. (1996) Neurochem. Int. 29:335-356; Nelson, N. (1998) J. Neurochem. 71:1785-1803)。

10

20

【0019】

ヒトの研究によると、GABAトランスポータの機能は癲癇海馬において減少している。GABA感受性の神経伝達の減少は分裂症の病理生理学にも関与しているとされている(Simpson, M.D. 他 (1992) Psychiatry Res. 42:273-282)。

【0020】

ジアゼパム結合インヒビター(DBI)はエンドゼピン(endozepine)およびアシル・コエンチム(CoA)結合タンパク質としても知られているが、このインヒビターは、GABAの効果を下方調節すると考えられている、内在性GABA受容体リガンドである。DBIは中鎖及び長鎖アシルCoAエステルに非常に高い親和性で結合し、アシルCoAエステルの細胞内キャリアとして機能している可能性がある(*125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM); PROSITE PDOC00686 Acyl-CoA-binding protein signature)。

30

【0021】

グリシンは塩素イオンチャネル受容体(リガンド依存性イオンチャネル・スーパーファミリのメンバー)を活性化することによって哺乳動物の神経系における主要な抑制性神経伝達物質として機能する(Betz, H. (1990) Neuron 5:383-392)。グリシンはまた、NメチルDアスパラギン酸塩(NMDA)受容体のアロステリック活性化を通じて興奮性伝達を助長する(Johnson, J.W. and P. Ascher (1987) Nature 325:529-531)。現在までに2つの形態のグリシン・トランスポータ、GLYT1とGLYT2が記述されている。GLYT1の2つの変異体(GLYT1 a/b)は選択的スプライシングによって生成され(Liu, Q. R. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268:22802-22808)、アミノ端の配列が異なっている。これらのタンパク質はグリシンに対して同様の親和性を持ち、いずれもNメチルアミノ酢酸に対する感受性がある。GLYT1 aの転写物が神経組織と非神経組織の両方で検出されるのに対して、GLYT1 bは神経組

40

50

織でのみ検出されることが *in situ* ハイブリッド形成によって判明した。高レベルの GLYT 1 a / b mRNA が海馬及び皮質で見ついていることは、このトランスポータが NMDA 受容体と共に局在することを示唆し、興奮性シナプス伝達の調節に関わっていることを暗示する。GLYT 1 a がニューロン、グリアあるいはその両方で発現されているかどうかは明らかでない。これと対照的に、GLYT 1 b は殆どファイバートラクトでのみ見出されていて、このことはグリア細胞への局在を示唆している (Schloss, P. 他 (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:595599)。

【0022】

2 番目に同定されたグリシン・トランスポータ (GLYT 2) は細胞内アミノ端が長い点が GLYT 1 a / b と異なっている。これの mRNA が主に局在しているのは脳幹と脊髄であり、Nメチル・アミノ酢酸への感受性が低いことから、GLYT 2 がストリキニーネ感受性の抑制性グリシン受容体のシグナル変換を終結させていることが示唆される。GLYT 1 b を含む細胞が脱分極化するとトランスポータが逆に働き、グリシンを放出して NMDA 受容体において神経調節アミノ酸の役割を果たさせるのではないかと提案されている (Attwell, D. and M. Bouvier (1992) Curr. Biol. 2:541-543)。こうした逆輸送による神経伝達物質の Ca^{2+} 非依存性非小胞体放出はグルタミン酸塩及びセロトニンについて実証されている。この知見は、伝達物質トランスポータが神経伝達物質の活動の開始と終結の両方に重要なものかもしれないということを示唆している (Schloss, P. 他 (1994) Curr. Opin. Cell Biol. 6:595599)。

【0023】

原形質膜のドーパミン・トランスポータ (DAT) はシナプスから放出されたドーパミンの再取り込みに必須である。ドーパミンの取り込みは温度および時間に依存し、コカイン等のさまざまな化学物質によって阻害される。DAT ノックアウト・マウスは極端に過度な活発性とコカインおよびアンフェタミンの両方への耐性を示していて、DAT に対するコカインの主要な作用と一致している (Giros, B. 他 (1996) Nature 379:606-612)。DAT の厳密な調節に動揺があると、ニューロンがさまざまな傷害によって損傷しやすくなる。もっとも顕著なのは、パーキンソン氏病の元になると考えられている線条体の DAT 発現ドーパミン神経終末の選択的な変性である。DAT の発現により神経集団の選択的脆弱性を予見できるが、このことは DAT 機能を変異させることをめざした治療戦略がさまざまな疾患において大きな恩恵をもたらす可能性を示唆している (Gary, W. M. 他 (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:424429)。

【0024】

クレアチン・トランスポータは GABA のトランスポータと強く関係している。クレアチン・トランスポータ種の相同体同士的一次配列同一性は極めて高い (98 ~ 99%)。薬理学的研究によって高親和性クレアチン取り込み (27 ~ 43 μ M) が実証されているが、この取り込みは高親和性のクレアチン類似物質によってブロックされる。クレアチン・トランスポータは、脳、副腎、小腸、直腸、前立腺、胸腺、卵巣、脾臓、膵臓、胎盤、ヘその緒、甲状腺、舌、咽頭、脊椎ディスク、顎および鼻の上皮組織を含むさまざまな哺乳動物組織において広範に発現している。マウスの遺伝子地図によれば、クレアチン・トランスポータは X 染色体の一つの領域に局在していて、その領域はヒトの Xq28 領域と連結保存になっているが、ここはいくつかの神経筋病の遺伝子のあるところである (Nash, S. R. 他 (1994) Receptors Channels 2:165174)。

【0025】

Na^{+} / Cl 依存性トランスポータファミリーのタンパク質をコードしている数々の cDNA クローンの基質はまだ特定されていない。これらはオルファントランスポータである。オルファントランスポータの基質の特定は困難であったが、その理由は *in situ*

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学の示すところによればこれらのトランスポータは表現型の異なる神経集団、例えばグルタミン感作性、GABA感作性またはセロトニン感作性ニューロンによって合成されているためである。これらのトランスポータの一つであるNTT4はクレアチン・トランスポータと最高度の相同性を示す。これは膜貫通型7と8の間に異例な長さのループを持っているという点で、このファミリーの他のメンバーと構造的に異なっている(Liu, Q. R. 他(1993) F E B S L e t t . 315:114-118; Schloss, P. 他(1994) C u r r . O p i n . C e l l B i o l . 6:595599)。

【0026】

グルタミン酸は、哺乳類の中樞神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。起電性(Na^+ / K^+)共有グルタミン酸トランスポータは神経終末およびグリア細胞の原形質膜に存在し、興奮性シナプスで放出されたグルタミン酸塩の除去を仲介して細胞外濃度を神経毒性レベルより低く保つ。グルタミン酸塩トランスポータは3つのナトリウムイオンおよび1つのプロトンとの共役輸送の後でカリウムイオンを反対の方向に移行することにより、この過程を実現する(Zerangue, N. and M. P. Kavanaugh (1996) N a t u r e 383:634637)。

【0027】

グルタミン酸塩トランスポータはトランスポータタンパク質の大きなファミリーに属している。グルタミン酸塩トランスポータの膜トポロジーによれば、タンパク質のN末端部分に6つの膜貫通ヘリックスの存在が明らかになっている(Slotboom, D. J. 他(1999) M i c r o b i o l . M o l . B i o l . R e v . 63:293307)。グルタミン酸塩トランスポータのC末端側半分はよく保存され、移行経路の主要部分を構成していて、基質および共役輸送イオンの結合部位を含んでいる(Zhang, Y. and B. I. Kanner (1999) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 96:17101715)。

【0028】

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動皮質において、シナプスのグルタミン酸塩の再取り込みの障害とグルタミン酸塩トランスポータの発現の減少が見出されている。in vitroおよびin vivoで長期的にアンチセンス・オリゴヌクレオチドを投与することによりグルタミン酸塩トランスポータの各サブタイプの合成を阻害したところ、このタンパク質の発現とグルタミン酸塩トランスポータの機能が選択的かつ特異的に減少した。グリアのグルタミン酸塩トランスポータが失われると、細胞外グルタミン酸塩レベルの上昇、興奮性毒性に特徴的な神経変性および漸進的な麻痺が見られた。神経グルタミン酸塩トランスポータが失われても、線条体の細胞外グルタミン酸塩は上昇しなかったが、軽い神経毒性を生じ、癲癇をもたらした(Rothstein, J. D. 他(1996) N e u r o n 16:675686)。

【0029】

小胞体モノアミン・トランスポータ(VMAT)は細胞質モノアミン神経伝達物質を分泌性小胞体に蓄積させ、それが調節性のエキソサイトシスで放出される。VMATはプロトン電気化学的勾配を使ってプロトンとモノアミンの起電性交換体として機能する。ラット、ウシおよびヒトから2つのVMATトランスポータVMAT1とVMAT2がクローン化されている。VMATタンパク質は12の膜貫通型セグメントを持ち、その両端は細胞質側にある。VMATタンパク質の細胞内局在が研究され、それによると、これらはニューロンおよび神経内分泌細胞の中の区別可能な小胞体集団に関連していることが示されている。ラットにおいては、VMAT1は副腎内で発現し、VMAT2は脳で発現している。これと対照的に、ウシの副腎はVMAT1とVMAT2の両方を発現する(Henry, J. P. 他(1994) J . E x p . B i o l . 196:251262)。

【0030】

小胞体輸送は降圧剤レセルピンおよびこれと関係するがより中枢で作用するテトラベナジ

ンによって阻害される。輸送の機構とVMAの生化学はこれらの薬を使い、トランスポータのソースとしてウシ副腎から得たクロム親和性顆粒を主に使って解析されてきた (Peter, D. 他 (1994) J. Biol. Chem. 269:72317237)。

【0031】

ヒトの研究によると、レセルピンは鬱病に似た症候を引き起こすことがあり、このことは気分と行動の制御に小胞体トランスポータの活動が重要であることを示唆している。精神刺激薬のアンフェタミンは分泌性小胞体内のアミンの貯蔵も乱すが、このことは小胞体モノアミン輸送の変化が行動に影響しうることを示唆している (Sulzer, D. and S. Rayport (1990) Neuron 5:797808)。

10

【0032】

神経伝達物質トランスポータの欠陥に起因するヒトの病気としては、分裂症、トゥーレット症候群、パーキンソン氏病、脳虚血、筋萎縮性側索硬化症、鬱病および癲癇等が挙げられる。例えば、癲癇および分裂症等のCNS疾患の病理生理学において、GABA感作性神経伝達の減少が関与しているとされている。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の患者の運動皮質において、シナプスのグルタミン酸塩の再取り込みの障害とグルタミン酸塩トランスポータの発現の減少が見出されている。グリアのグルタミン酸塩トランスポータが失われると、細胞外グルタミン酸塩レベルの上昇、興奮性毒性に特徴的な神経変性および漸進的な麻痺が見られた。神経グルタミン酸塩トランスポータが失われると軽い神経毒性が生じ、結果として癲癇を招く (Rothstein, J.D. 他 (1996) Neuron 16:675686)。

20

【0033】

ドーパミン、ノルエピネフリンおよびセロトニンのトランスポータはコカイン、抗鬱剤およびアンフェタミンを含む臨床関係の精神刺激剤の標的として特に需要である。コカインおよび抗鬱剤は、さまざまなレベルの特異性で除去を制限することにより、アミンのシナプス濃度を上げる働きをするトランスポータ拮抗物質である。アンフェタミンは小胞体のアミン貯蔵の枯渇に呼応して、トランスポータ仲介性の流出を増す働きがある (Barker, E.L. and R.D. Blakely (1995) Psychopharmacology 28:321333; Sulzer, D. and S. Rayport (1990) Neuron 5:797808; Wall, S.C. 他 (1995) Mol. Pharmacol. 47:544550)。

30

【0034】

ヒト成人の1兆を超えるニューロンの各々が千個以上の標的細胞と接続している (Tessier-Lavigne, M. 他 (1996) Science 274:1123-1133)。これらの神経接続は胚の発生中に形成される。分化する各ニューロンが先端に成長円錐を持った軸索を送り出す。分子的なガイダンスに導かれて、成長円錐は胚の環境の中でシナプス標的まで移動する。セマフォリンは、成長する軸索がアクセスできない領域を指定する局所シグナルを提供することにより胚発生中に機能しているかもしれない成長円錐誘導シグナルである (Puschel, A.W. 他 (1995) Neuron 14:941-948)。

40

【0035】

発生中の軸索の誘導には正と負の効果(すなわち化学誘引と化学反発)の両方が関わっている。スリット・ファミリのタンパク質は軸索の枝分かれ、延長および反発の推進に関与しているとされてきた。スリット・ファミリのメンバーは昆虫、両生類、鳥類、齧歯類およびヒトを含むさまざまな生物で特定されている (Guthrie, S. (1999) Current Biology 9:R432-R435)。スリットタンパク質は反発誘導受容体Roundabout(ロボ)のリガンドであるらしいが、スリットは一部のアッセイでは延長を起こしている。スリットの翻訳後処理された形が、このタンパク質の活性型であるようだ (Guthrie, S. 前出, Brose, K. 他 (1999) Cell 96:795-806)。

50

【0036】

軸索の成長は細胞表面および細胞外マトリクス (ECM) 分子がらみの接触仲介性機構によっても部分的に誘導されている。フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンのメンバー、テネイシン、コラーゲンおよびトロネカスポンジンの各ファミリー、およびさまざまなプロテオグリカンを含んだ多くのECM分子は神経突起の生成と伸長に対してプロモーターとして、あるいはインヒビターとして作用しうる (Tessier-Lavigne 他, 前出)。ECM分子の受容体としては、インテグリン、免疫グロブリン・スーパーファミリーのメンバーおよびプロテオグリカン等が挙げられる。ECM分子およびその受容体はニューロンの接着、保守および分化にも関与しているとされている (Reichardt, L. F. 他 (1991) Ann. Rev. Neurosci. 14: 531-571)。プロテオグリカンの *testican* は海馬の錐体細胞のシナプス後エリアに局在していて、受容体の活動、神経調節、シナプス可塑性および神経伝達において役割を果たしている可能性がある (Bonnet, F. 他 (1996) J. Biol. Chem. 271: 4373-4380)。

【0037】

他の神経系関連のタンパク質は、ニューロンのシグナリング、細胞接着、神経再生、軸索誘導および神経発生において役割を持っている。*neurexophilin* は合成後にタンパク質分解で処理される神経ペプチド様タンパク質である。これらのタンパク質はニューロン特異的な細胞表面タンパク質、 α ニューレキシン (α -*neurexin*) のリガンドである。*neurexophilin* と *neurexin* はニューロンシグナル経路に参加している可能性がある (Missler, M. および T. C. Sudhof (1998) J. Neurosci. 18: 3630-3638; Missler, M. 他 (1998) J. Biol. Chem. 273: 34716-34723)。*ninjurin* は細胞接着と傷害の後の神経再生で役割を果たすニューロン細胞表面タンパク質である。*ninjurin* は後根神経節組織およびシュワン細胞内の神経傷害の後で上向き調節される (*602062 *Ninjurin*; NINJ1 OMI M; Araki, T. and Milbrandt, J. (1996) Neuron 17: 353-361)。哺乳動物の *Numb* はホスホチロシン結合 (PTB) ドメイン含有タンパク質であり、哺乳動物の神経系の細胞運命決定と皮質の神経発生に関わっている可能性がある。*Numb* の結合パートナーである *LNx* タンパク質は4つのPDZドメインと1つのリングフィンガードメインを含み、*Numb* に関わるシグナル経路に参加している可能性がある。PDZドメインは、細胞膜表面におけるシグナル伝達イベントに関わっている多機能タンパク質複合体のアセンブリのアダプタの役割をするタンパク質の中で見つかっている (Ponting, C. P. (1997) Bioessays 19: 469-479)。*LNx* タンパク質は、SHC (チロシンリン酸化成長因子受容体および下流エフェクターと関連するアダプタ・タンパク質) 等の他のPTB含有タンパク質の結合に重要である可能性をもったチロシンリン酸化部位を含んでいる (Dho, S. E. 他 (1998) J. Biol. Chem. 273: 9179-9187)。

【0038】

神経伝達に重要と見られるもう一つの分子ファミリーはコリン・トランスポータ様CTL1タンパク質である。プロトタイプのCTL1はコリン輸送突然変異の抑制因子として酵母の中で特定されたが、哺乳動物の相同体も特定されている。このタンパク質は約10個の推定膜貫通型ドメインとトランスポータ様モチーフを含むが、正当なコリン・トランスポータではないようである。コリン輸送は神経伝達に重要であるが、その理由はコリンがコリン感受性ニューロンに大量に必要とされるアセチルコリンの前駆体であるためである (O'Regan, S. 他 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 1835-40)。

【0039】

新規の神経伝達物質トランスポータ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、輸送、神経学的および精神医学的疾患の診断・治療・予防において有用であり、また、神経伝達物質トランスポータ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効果についての評価にも有用である。

【0040】

(発明の要約)

本発明は、総称して「NTT」、個別にはそれぞれ「NTT-1」、「NTT-2」、「NTT-3」、「NTT-4」、「NTT-5」および「NTT-6」と呼ぶ神経伝達物質トランスポータである精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO: 1-6 からな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: 1-6 からな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含む天然のポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-6 からな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、および(d) SEQ ID NO: 1-6 からな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: 1-6 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。

10

【0041】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-6 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1-6 からな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: 1-6 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO: 1-6 からな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からなる群から選択された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。

20

一実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 1-6 からな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: 7-12 からなる群から選択される。

【0042】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1-6 からな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: 1-6 からな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: 1-6 からな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、および(d) SEQ ID NO: 1-6 からな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、本発明はこの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。

30

【0043】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-6 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1-6 からな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: 1-6 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO: 1-6 からな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から選択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。

40

【0044】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1-6 からなる群から選択したアミノ酸配列を

50

有するポリペプチド、(b)SEQ ID NO: 1 - 6 からな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 - 6 からな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、および(d)SEQ ID NO: 1 - 6 からな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な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。

【0045】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 7 - 12 からな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、(b)SEQ ID NO: 7 - 12 からな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、(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配列、および(e)(a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択され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。

10

【0046】

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: 7 - 12 からな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、(b)SEQ ID NO: 7 - 12 からな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、(c)(a)に相補的なポリヌクレオチド、(d)(b)に相補的なポリヌクレオチド配列、および(e)(a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む。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を含む少なくとも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あるいはその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、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。

20

30

【0047】

本発明はまた、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: 7 - 12 からな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、(b)SEQ ID NO: 7 - 12 からな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、(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、および(e)(a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択された配列のポリヌクレオチドを有する。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。

40

【0048】

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する。有効量のポリペプチドは、(a)SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b)SEQ ID NO: 1 - 6 からな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 - 6 からな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 - 6 からな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。一実施例では、SEQ ID NO: 1 - 6 からなる一群から選択されたアミノ

50

酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は機能的 N T T 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が、この方法にはそのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することが含まれる。

【0049】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および (d) SEQ ID NO: 1 - 6 からな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からなる群から選択されたポリペプチドのア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) ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプ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。更なる別法では、本発明は、機能的 N T T 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が、その方法にはこのような治療を必要とする患者にこの組成物を投与することを含む。

10

【0050】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 6 からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および (d) SEQ ID NO: 1 - 6 からな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からなる群から選択された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、このような治療を必要とする患者へのこの組成物の投与を含む、機能的 N T T 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。

20

【0051】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 6 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 - 6 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からなる群から選択された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。

30

【0052】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 6 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 6 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 - 6 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からな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。スクリーニング方法は、(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

40

50

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。

【0053】

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: 7 - 12 からな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。

【0054】

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: 7 - 12 からな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: 7 - 12 からな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、および(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物からなる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: 7 - 12 からな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: 7 - 12 からな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、および(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物からなる群から選択する。或いは、標的ポリヌクレオチドは、上記(i) ~ (v) からなる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。

【0055】

(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。

【0056】

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の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。

【0057】

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、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。

【0058】

(定義)

用語「NTT」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NTTのアミノ酸配列を指す。

【0059】

用語「アゴニスト」は、NTTの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、NTTに直接相互作用するか、或いはNTTが関与する生物学的経路の成分と作用して、NTTの活性を調節するタンパク質、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物を含み得る。

10

【0060】

用語「対立遺伝子変異配列」は、NTT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RNA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個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。

20

【0061】

NTT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、NTTと同じポリペプチド或いはNTT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、NTT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当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにNTT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NTTと機能的に等価となるようなアミノ酸残基の欠失、挿入、或いは置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にNTTの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。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。

30

【0062】

「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関連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。

40

【0063】

「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。

【0064】

用語「アンタゴニスト」は、NTTの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、NTTに直接相互作用するか、或いはNTTが関与する生物学的経路の

50

成分と作用して、N T Tの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0065】

「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。P Pポリペプチドと結合する抗体は、無損傷ポリペプチドを用いるか或いは免疫抗原として関心のある小ペプチドを含む断片を用いるかして調製することができる。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。

10

【0066】

「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、抗体への結合において無損傷抗原（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。

【0067】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」（コーディング）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、ホスホロチオ酸、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含まれる。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（-）」の語が参照DNA分子のアンチセンス鎖を、「正」若しくは「プラス（+）」がセンス鎖を指すことがある。

20

30

【0068】

「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N T T、合成のN T T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。

【0069】

「相補（的）」または「相補性」の語は、塩基対形成によってアニーリングする2つの一本鎖核酸の間の関係を指す。例えば、配列「5' A - G - T 3'」は、相補配列「3' T - C - A 5'」と対を形成する。

40

【0070】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む成分」及び「所定のアミノ酸配列を含む成分」は、所定のポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を含む広範囲の任意の成分を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。N T T 若しくはN T T 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。

50

【0071】

「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(PE 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GELVIEW断片構築システム(GCG, Madison, WI)またはPhrap(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。伸長及び構築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。

【0072】

「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と予測されるような置換、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可能で、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

元の残基

保存的な置換

Ala	Gly, Ser
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
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
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
Ser	Cys, Thr
Thr	Ser, Val
Trp	Phe, Tyr
Tyr	His, Phe, Trp
Val	Ile, Leu, Thr

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βシートやα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。

【0073】

「欠失」は、結果的に1個若しくは数個のアミノ酸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。

【0074】

「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。

【0075】

10

20

30

40

50

「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。

【0076】

「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。

【0077】

用語「断片」は、NTT または NTT 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 (parent sequence) 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

20

【0078】

SEQ ID NO: 7-12の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。

この領域は、SEQ ID NO: 7-12を特異的に同定するものであり、例えばこの断片を得たゲノム中のSEQ ID NO: 7-12以外の配列とは異なるものである。SEQ ID NO: 7-12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SEQ ID NO: 7-12を区別する類似の方法において有用である。SEQ ID NO: 7-12の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO: 7-12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。

30

【0079】

SEQ ID NO: 1-6の断片はSEQ ID NO: 7-12の断片によってコードされている。SEQ ID NO: 1-6の断片はSEQ ID NO: 1-6を特異的に同定する固有のアミノ酸配列の領域を含む。例えば、SEQ ID NO: 1-6の断片は、SEQ ID NO: 1-6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。SEQ ID NO: 1-6の断片及び断片に対応するSEQ ID NO: 1-6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。

【0080】

「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。

40

【0081】

「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。

【0082】

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

50

を挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

【0083】

ポリヌクレオ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。このプログラムは、LASERGENE 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）（DNASTAR, Madison WI）の一部である。このCLUSTAL Vは、Higgins, D. G. 及び P. M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153、Higgins, 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の対のアライメントの場合、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。

【0084】

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。

【0085】

Matrix: BLOSUM62
Reward for match: 1 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

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。

【0086】

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。

【0087】

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、置換部位の電荷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。

10

【0088】

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を用いる対方式のポリペプチド配列のアラインメントの場合、デフォルトパラメータは、Ktupple = 1、gap penalty = 3、window = 5、及び「diagonals saved」= 5と設定する。PAM250マトリクスが、デフォルトの残基重み付け表として選択される。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。

20

【0089】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア式を用いてもよい。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 (Apr - 21 - 2000)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。

【0090】

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

30

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。

40

【0091】

「ヒト人工染色体（HAC）」は、約6kb（キロベース）～10MbのサイズのDNA配列を含み得る、染色体の複製、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。

【0092】

「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。

50

【0093】

「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。核酸配列のアニーリ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。アニーリ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。

10

【0094】

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における特定の配列の融点（ 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。

20

【0095】

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。このようなブロッキング剤には、例えば、約100～200μg/mlの変性サケ精子DNAがある。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。

30

【0096】

「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。

40

【0097】

「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。

【0098】

「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

50

できる。

【0099】

用語「免疫原性断片」は、例えば哺乳動物などの生きている動物に導入すると、免疫反応を引き起こすNTTのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を指す。用語「免疫原性断片」はまた、本明細書で開示するまたは当分野で周知のあらゆる抗体生産方法に有用なNTTのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【0100】

「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。

【0101】

「エレメント」または「アレイエレメント」の語は、マイクロアレイ上に定義された固有の位置にあるハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド、ポリペプチドその他の化合物を指す。

用語「調節」は、NTTの活性の変化を指す。例えば、調節によって、NTTのタンパク質活性、或いは結合特性、またはその他の生物学的特性、機能的特性或いは免疫学的特性の変化が起こる。

「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DNAまたはRNA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DNAまたはRNAや、ペプチド核酸(PNA)や、任意のDNA様またはRNA様物質を指すこともある。

【0102】

「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。機能的に結合したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続し得る。そして、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は、同一のリーディングフレーム内にある。

【0103】

「ペプチド核酸」(PNA)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。PNAは、相補的一本鎖DNAまたはRNA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PNAの寿命を延長し得る。

【0104】

NTT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、NTTの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0105】

「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、NTT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DNA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、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA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(PCR)による核酸配列の増幅(及び同定)に用い得る。

【0106】

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。

【0107】

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

20

【0108】

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、固有な、および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。

30

40

【0109】

「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

50

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 S a m b r o o k らの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学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。

【0110】

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哺乳動物のワクチン接種に用いることが可能で、その際に組換え核酸が発現して哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

10

【0111】

「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。

【0112】

「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。

20

【0113】

DNA 配列に関する「RNA 等価物」は、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。

【0114】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。NTT、NTT 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と、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。

30

【0115】

「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。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）を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合している標識された A の量を低減させる。

【0116】

「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

【0117】

「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。

【0118】

「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、ウェハ、ファイバー、磁性または非磁性ビーズ、ゲル、管、プレー

50

ト、ポリマー、微細粒子、毛管が含まれる。基質は、凹み、溝、ピン、チャネル、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。

【0119】

「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現の集合的パターンを指す。

【0120】

「形質転換」は、外来性のDNAが受入細胞に入り込むプロセスを表す。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、バクテリオファージまたはウイルス感染、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

【0121】

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）等の参考文献に与えられている。

20

30

【0122】

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。

40

【0123】

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

50

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 Sequences」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、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%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【0124】

(発明)

本発明は、新規のヒト神経伝達物質トランスポータ(NTT)及びNTT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輸送、神経医学および精神医学上の疾患の診断・治療・予防に関する。

【0125】

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。

【0126】

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、GenBank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。

【0127】

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の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。

【0128】

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神経伝達物質トランスポータであることを確立している。例えば、SEQ ID NO: 4はヒトのタウリン・トランスポータ(GenBank ID g799339)と95%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0.0であるが、これは観測されたポリペプチド配列が偶然に得られる確率を示す。SEQ ID NO: 4はまた、ナトリウム:神経伝達物質シンボー

タ・ファミリー・シグネチャ (SNF) を有するが、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、MOTIFS、及び PROFILESCAN 解析よりのデータは、SEQ ID NO: 4 が SNF 神経伝達物質トランスポータである、さらに確証的な証拠を提供する。別の例において、SEQ ID NO: 5 は Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) によって同定されるヒトのドーパミントランスポータ (GenBank ID g181656) に 94% の同一性を有する (表 2 参照)。BLAST 確率スコアは 0.0 であるが、これは観測されたポリペプチド配列が偶然に得られる確率を示す。SEQ ID NO: 5 はまた、ナトリウム神経伝達物質シンボータファミリードメインを有するが、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、MOTIFS、及び PROFILESCAN 解析よりのデータは、SEQ ID NO: 5 がドーパミントランスポータである、さらに確証的な証拠を提供する。別例として、SEQ ID NO: 6 は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) で決定されるように神経伝達物質 rB21a (GenBank ID g914028) と 90% 同一である (表 2 参照)。BLAST 確率スコアは 5.7×10^{-300} 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、ナトリウム神経伝達物質シンボータファミリードメインを有するが、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、PROFILESCAN 及び BLAST 解析よりのデータは、SEQ ID NO: 6 がナトリウム：神経伝達物質シンボータである、さらに確証的な証拠を提供する。SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 および SEQ ID NO: 3 は同じような方法で解析し、注釈を付けた。SEQ ID NO: 1 - 6 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。

10

20

30

40

50

【0129】

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で構築した。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のポリヌクレオチド配列識別番号 (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、各ポリヌクレオチド配列の長さ (塩基対単位) を示す。列 4 は、例えば、SEQ ID NO: 7 - 12 を同定するため、或いは SEQ ID NO: 7 - 12 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構築するのに用いた。表 4 の列 6 および列 7 はそれぞれ、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。

【0130】

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。例えば、5407696F6 は Incyte cDNA 配列の識別番号であり、BRAMNOT01 はそれが由来する cDNA ライブラリの識別番号である。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、70501086V1) 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、g1748013) 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。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の集合に照会し得る。または、列5の識別番号は、「エキソンスティッチング」アルゴリズムによって集められた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、FL7472800_g7108462_g181656は「ストレッチ」配列の識別番号である。ここで7472800はIncyteプロジェクト識別番号、g7108462は「エキソンスティッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、g181656は一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号である（例5を参照）。場合によっては、最終コンセンサスポリヌクレオチド配列を確認するための列5に示すような配列の適用範囲と重複するIncyte cDNAの適用範囲が得られたが、関連するIncyte cDNA識別番号は示さなかった。

10

20

30

40

50

【0131】

表5は、Incyte cDNA配列を用いて構築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構築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。

【0132】

本発明はまた、NTTの変異体も含む。好適なNTTの変異体は、NTTの機能的或いは構造的特徴の少なくとも一つを有し、かつNTT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。

【0133】

本発明はまた、NTTをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、NTTをコードするSEQ ID NO: 7-12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を提供する。SEQ ID NO: 7-12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配列を包含しているが、その場合は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リボースから構成されている。

【0134】

本発明はまた、NTTをコードするポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。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、NTT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。本発明の或る実施態様では、SEQ ID NO: 7-12からなる群から選択された核酸配列と少なくとも約70%、或いは少なくとも約85%、または少なくとも約95%もの一致率を有するようなSEQ ID NO: 7-12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の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、NTTの機能的若しくは構造的特徴を少なくとも1つ有するアミノ酸配列をコードし得る。

【0135】

NTTをコードする種々のポリヌクレオチド配列として、遺伝暗号の縮重のために、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生成されうることを、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NTT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。

【0136】

NTT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NTT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NTT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とは有利となり得る。宿主が特定のコード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、NTT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RNA転写物を作ることにある。

【0137】

本発明はまた、NTT及びその誘導体をコードするDNA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NTT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。

【0138】

更に本発明には、種々のストリンジェント条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO: 7 - 12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。

【0139】

DNAシーケ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シーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケ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調製を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (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ケンシングを行う。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)。

【0140】

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、NTT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（例えば、Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2: 318322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を含む制限酵素断片から得る（例えば、Triglia, T 他 (1988) Nucleic Acids Res. 16: 8186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。

【0141】

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る。

【0142】

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。

【0143】

本発明の別の実施例では、NTTをコードするポリヌクレオチド配列またはその断片を組換えDNA分子にクローニングして、適切な宿主細胞内にNTT、その断片または機能的等価物を発現させることが可能である。遺伝暗号固有の縮重により、実質的に同じ或いは機能的に等価のアミノ酸配列をコードする別のDNA配列が作られ得り、これらの配列をNTTのクローン化及び発現に利用可能である。

【0144】

種々の目的でNTT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特定部位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。

【0145】

本発明のヌクレオチドを、MOLECULAR BREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; 米国特許第5,837,458号; Chang, C.-C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:793-797; Christians, F.C. 他(1999) Nat. Biotechnol. 17:259-264; Cramer, A. 他(1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319)などのDNAシャッフリング技術を用いてシャッフリングして、NTTの生物学的または酵素的な活性、或いは他の分子や化合物と結合する能力などのNTTの生物学的特性を変更或いは改良することができる。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。

【0146】

別の実施例によれば、NTT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)。別法として、化学的方法を用いてNTT自体またはその断片を合成することが可能である。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(Perkin Elmer)を用いて達成し得る。更にNTT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。

【0147】

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)。

【0148】

生物学的に活性なNTTを発現させるために、NTT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。この発現ベクターは、好適な宿主に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エレメントを含む。これらのエレメントには、ベクター及びNTTをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハン

10

20

30

40

50

サー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このような要素は、長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、NTTをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG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。NTT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ATG開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現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。(例えば、Scharf, D. 他 (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20:1-18-162. を参照)。

10

20

30

40

50

【0149】

当業者に周知の方法を用いて、NTTをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製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章及び13章1-4章を参照)。

【0150】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、NTTをコードする配列の保持及び発現が可能である。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) *EMBO J.* 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、ポリヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ送達することができる(Di Nicola, M. ら (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356、Yu, M. ら (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13):6340-6344、Buller, R.M. ら (1985) *Nature* 317(6040):813-815; McGregor, D.P. ら (1994) *Mol. Immunol.* 31(3):219-226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Natur*

e 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。

【0151】

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、NTT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、NTT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、増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) または pSPORT1 プラスミド (GIBCO BRL) などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にNTTをコードする配列をライゲーションすると 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の同定の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. and S. M. Schuster (1989) J. Biol. Chem. 264 : 5503 - 5509. 等を参照)。例えば、抗体の産生のためなどに多量のNTTが必要な場合は、NTT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 T5 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。

10

【0152】

NTTの発現に酵母の発現系の使用が可能である。α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 121 - 181 - 184. を参照)。

20

【0153】

植物系もNTTの発現に使用可能である。NTT 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て用いられるような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(前出のCoruzzi、前出のBroglie、前出のWinter等を参照)。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)。

30

【0154】

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。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、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物/翻訳複合体にNTTをコードする配列を結合し得る。ウイルスのゲノムの非必須のE1またはE3領域への挿入により、感染した宿主細胞にNTTを発現する生ウイルスを得ることが可能である(Logan, J. 及びShenk, T. (1984) 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。

40

【0155】

50

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 6 kb ~ 10 Mb 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。(例えば、Harrington, J. J. 他 (1997) Nat Genet, 15: 345 - 355. を参照)。

【0156】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞における NTT の安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、NTT をコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。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。

10

【0157】

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⁻ 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⁻ 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 はメトトレキセ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、例えばアニトシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、β グルクロニダーゼ及びその基質 β 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)。

20

30

【0158】

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、NTT をコードする配列がマーカー遺伝子配列の中に挿入された場合、NTT をコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により特定可能である。または、1 つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子が NTT をコードする配列と一列に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。

40

【0159】

一般に、NTT をコードする核酸配列を含み且つ NTT 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、DNA - DNA 或いは DNA - RNA ハイブリダイゼーション、PCR 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の生物学的検定法また

50

は免疫学的検定法がある。

【0160】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるNTTの発現の検出及び計測のための免疫学的方法は、当分野で周知である。このような技法には、酵素に結合した免疫吸着剤検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、フローサイトメーター(FACS)などがある。NTT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部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合の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)。

10

【0161】

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。NTT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PCRプローブを生成する方法には、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PCR増幅が含まれる。別法として、NTTをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成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、T7、T3またはSP6等の好適なRNA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RNA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。

20

30

【0162】

NTTをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、細胞培地でのこのタンパク質の発現及び回収に好適な条件下で培養される。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。NTTをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核細胞膜及び真核細胞膜を透過するNTTの分泌を誘導するシグナル配列を含むように設計できることは、当業者には理解されよう。

【0163】

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, Bethesda, 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。

40

50

【0164】

本発明の別の実施例では、NTTをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラNTTタンパク質が、NTT活性のインヒビター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、NTTをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、NTTが精製の後に異種部分から切断され得る。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

【0165】

本発明の別の実施例では、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*in vitro*で放射能標識したNTTの合成が可能である。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。

20

【0166】

本発明のNTTまたはその断片を用いて、NTT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、NTT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。

30

【0167】

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NTT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、NTT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NTT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、大腸菌からの細胞が含まれる。NTTを発現する細胞またはNTTを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、NTT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

【0168】

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NTTと結合させるステップと、NTT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

50

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。

【0169】

本発明のNTTまたはその断片を用いて、NTT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、NTTが少なくとも1つの試験化合物と結合する、NTT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NTTの活性が試験化合物不在下でのNTTの活性と比較する。試験化合物の存在下でのNTTの活性の変化は、NTT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NTTの活性に適した条件下でNTTを含む*in vitro*または無細胞再構成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、NTT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。

10

【0170】

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、NTT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「ノックアウト」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*: *Capeccchi*, 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ノックアウトする（*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。

20

30

【0171】

NTT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）。

【0172】

NTT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、NTT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NTTを乳汁内に分泌するなどNTT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）。

40

【0173】

（治療）

50

N T Tのある領域と神経伝達物質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、N T Tの発現は、脳組織、神経組織、神経組織、および腫瘍組織に密接に関連する。したがって、N T Tは輸送、神経医学および精神医学上の疾患において重要な役割を果たしているように見える。N T Tの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、N T Tの発現または活性を低下させることが望ましい。また、N T T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、N T Tの発現または活性を増大させることが望ましい。

【 0 1 7 4 】

従って、一実施例において、N T T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N T T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、こうした疾患としては、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、嚢胞性線維症、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム周期性四肢麻痺、正常カリウム周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高体温症、多剤耐性、重症筋無力症、筋強直性ジストロフィー、緊張病、遅発性ジスキネジー、ジストニー、末梢神経障害、脳腫瘍、前立腺癌等の輸送疾患、例えば狭心症、徐脈、頻脈、高血圧、Long Q T 症候群、心筋炎、心筋症、ネマリニンミオパシー、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺毒素ミオパシー、エタノールミオパシー、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性筋炎、多発性筋炎のような輸送に関連する心臓疾患、例えばアルツハイマー病、記憶喪失、双極性障害、痴呆、鬱病、癲癇、トゥーレット病、妄想型精神分裂病、および精神分裂病のような輸送に関連する神経疾患、および、例えば神経線維腫症、ヘルペス後神経痛、三叉神経障害、サルコイドーシス、鎌状赤血球貧血、ウィルソン病、白内障、不妊症、肺動脈狭窄、感音常染色体難聴、高血糖症、低血糖症、グレーブズ病、甲状腺腫、クッシング病、アジソン病、グルコース・ガラクトース吸収不良症候群、高コレステロール血症、副腎脳白質ジストロフィー、ゼルウィガー症候群、Menkes病、後角症候群、von Gierke病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、およびファンコーニ病のようなその他の輸送に関連する疾患、癲癇、虚血性脳血管疾患、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路系疾患、筋萎縮性側索硬化症その他の運動ニューロン疾患、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症、遺伝性運動失調症、多発性硬化症その他の脱髄疾患、バクテリア性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウイルス性中枢神経疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト-ヤコブ病、ゲルストマン症候群、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性の精神薄弱及び他の発生障害、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、妄想型精神分裂病、ヘルペス後神経痛、トゥーレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性痴呆等の神経疾患、急性ストレス疾患、アルコール依存症、アンフェタミン依存症、拒食症、非社会性人格障害、注意欠陥多動性障害、自閉症、不安症、回避的人格障害、双極性障害、境界性人格障害、短期的な精神異常、神経性大食症、大麻依存症、コカイン依存症、行為障害、気分循環性障害、精神錯乱、妄想性障害、痴呆、依存性人格障害、鬱病、気分変調性障害、幻覚剤依存症、演技性人格障害、吸入物依存症、躁鬱病、多発脳梗塞性痴呆、自己愛性人格障害、ニコチン依存症、強迫神経症、オピオイド依存症、反抗性障害、パニック障害、妄想性人格障害、フェンシクリ

10

20

30

40

50

ジン依存症、恐怖症、心的外傷後ストレス障害、分裂病性感情障害、分裂性人格障害、精神分裂症、鎮静剤依存症、分離不安障害、および睡眠障害等の精神疾患が含まれる。

【0175】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むN T T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、N T T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することも可能である。

【0176】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むN T T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、実質的に精製されたN T Tを含む組成物を好適な医薬用担体と共に患者に投与することも可能である。

10

【0177】

更に別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むN T T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、N T Tの活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。

【0178】

更なる実施例では、N T Tの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者にN T Tのアンタゴニストを投与することが可能である。こうした疾患の例として、限定するものではないが、上記の輸送疾患、神経疾患及び精神疾患が含まれる。一実施態様では、N T Tと特異的に結合する抗体が直接アンタゴニストとして、或いはN T Tを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲッティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

20

【0179】

別の実施例では、限定するものではないが上に列記した疾患を含むN T Tの発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、N T Tをコードするポリヌクレオチドの相補配列を発現するベクターを患者に投与することも可能である。

【0180】

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、当業者が従来の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。

30

【0181】

N T Tのアンタゴニストは、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。

詳しくは、精製されたP Pを用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングしてN T Tと特異的に結合するものの同定が可能である。N T Tの抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。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、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る。但し、これらに限定されるものではない。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。

40

【0182】

抗体の産生のためには、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト及びその他のものを含む種々の宿主が、N T Tまたは任意の断片、または免疫原性の特性を備えるそのオリゴペプチドの注入によって免疫化され得る。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、ブ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。

50

【0183】

N T Tに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。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。N T Tアミノ酸の短いストレッチは、K L Hなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

【0184】

N T Tに対するモノクローナル抗体は、培地内の連続した細胞株によって、抗体分子を産生する任意の技術を用いて作製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 10
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 (K o h l e r , G . ら . (1 9 7 5) N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7、K o z b o r , D . ら (1 9 8 5) . J . I m m u n o l . M e t h o d s 8 1 : 3 1 - 4 2、C o t e , R . J . ら (1 9 8 3) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 0 : 2 0 2 6 - 2 0 3 0、C o l e , S . P . ら (1 9 8 4) M o l . C e l l B i o l . 6 2 : 1 0 9 - 1 2 0等を参照)。

【0185】

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 (M o r r i s o n , S . L . ら . (1 9 8 4) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1 : 6 8 5 1 - 6 8 5 5、N e u b e r g e r , M . S . ら (1 9 8 4) N a t u r e 3 1 2 : 6 0 4 - 6 0 8、タケダ , S . ら (1 9 8 5) N a t u r e 3 1 4 : 4 5 2 - 4 5 4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、N T T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ルリングによって産生することもできる (B u r t o n D . R . (1 9 9 1) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 1 0 1 3 4 - 1 0 1 3 7等を参照)。

【0186】

抗体の産生は、リンパ球集団における *i n v i v o* 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 (O r l a n d i , R . ら (1 9 8 9) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 3 8 3 3 - 3 8 3 7、W i n t e r , G . ら (1 9 9 1) N a t u r e 3 4 9 : 2 9 3 - 2 9 9等を参照)。

【0187】

N T Tに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。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 (a b ')₂ 断片と、F (a b ')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F a b断片とがある。或いは、F a b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F a b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 (H u s e , W . D . ら (1 9 8 9) S c i e n c e 2 5 6 : 1 2 7 5 - 1 2 8 1等を参照)。

【0188】

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。隔離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競合的な結合、または免疫放射線活性のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、N T Tとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。二つの非干渉性N T Tエピトープに対して反応性の 50

モノクローナル抗体を用いる、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、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0189】

ラジオイムノアッセイ技術と共にScatchard分析などの様々な方法を用いて、NTTに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でNTT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て得られる値である。多数のNTTエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体試薬の K_a は、NTTに対する抗体の平均親和性または結合活性を表す。特定のNTTエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体試薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12}$ L/molの高親和性抗体試薬は、NTT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、NTT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, IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. および Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

10

【0190】

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、後に使う或る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1~2 mg/mlの特異的な抗体、好ましくは5~10 mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体試薬は一般に、NTT抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。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Colliganらの文献等を参照)。

20

【0191】

本発明の別の実施例では、NTTをコードするポリヌクレオチド、またはその任意の断片や相補配列が、治療目的で利用することができる。ある実施態様では、NTT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、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、NTT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., ed. (1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJを参照)。

30

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. 他 (1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3): 469-475; および Scanlon, K. J. 他 (1995) 9(13): 1288-1296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. および 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ッ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、Mor

40

50

ris, M. C. ら (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (14): 2730 - 2736. 等を参照)。

【0192】

本発明の別の実施例では、NTT 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の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 (thalassaemia)、家族性高コレステロール血症、第VIII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 N. Somia (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。NTT の発現若しくは調節に必要な遺伝子の欠損が疾患を引き起こす場合、導入した細胞の好適な集団からNTT を発現させて、遺伝子欠損によって起こる症状の発現を緩和することが可能である。

【0193】

本発明の更なる実施例では、NTT の欠損による疾患や異常症は、NTT をコードする哺乳動物発現ベクターを作製して、これらのベクターを機械的手段によってNTT 欠損細胞に導入することによって治療する。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) 遺伝子銃、(iii) リポソームを介した形質移入、(iv) 受容体を介した遺伝子導入、及び(v) DNAトランスポソンの使用 (Morgan, R. A. および W. F. Anderson (1993) *Annu. Rev. Biochem.* 62: 191 - 217、Ivics, Z. (1997) *Cell* 91: 501 - 510; Boulay, J - L. および H. Recipon (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 445 - 450) がある。

【0194】

NTTの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA 3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-OFF、PTET-ON、PTRE2、PTRE2-LUC、PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA) が含まれる。NTT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β-アクトニン遺伝子等)、(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 NTT 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。 10

【0195】

市販のリポソーム形質転換キット (例えば Invitrogen 社の Perfect Lipid 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. および 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。初代培養細胞に 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。 20

【0196】

本発明の別の実施例では、NTT 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) プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下で NTT 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) 追加のレトロウイルス・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ディング配列を伴う 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。 30
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 (VPC L) において増殖され、VPC L は、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子または VSVg 等の乱交雑エンベ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. および 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」) において、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が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。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、Bonyhad i, M. L. (1997) J. Virol. 71:4707-4716、Ranga, U. ら (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 40

95:1201-1206、Su, L. (1997) Blood 89:2283-2290)。

【0197】

別法では、アデノウイルス系遺伝子治療の送達系を用いて、NTTの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にNTTをコードするポリヌクレオチドを送達する。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 Verma, I. M. および 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。

【0198】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、NTTの発現に関連する1つ或いは複数の遺伝子異常を有する標的細胞にNTTをコードするポリヌクレオチドを送達する。単純疱疹ウイルス(HSV)系のベクターは、HSV親和性の中枢神経細胞にNTTを導入する際に特に重要である。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産生、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。

【0199】

別法では、αウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてNTTをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのα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. および K. - J. Li (1998) Cun. Opin. Biotech. 9:464-469)。αウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスのキャプシッ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ッドタンパク質が過剰産生される。同様に、NTTをコードする配列をαウイルスゲノムのカプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のNTTをコードするRNAが産生され、高いレベルでNTTが合成される。通常はα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、 α 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)。様々な宿主に α ウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞に NTT を導入することができる。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。 α ウイルスの感染性 cDNA クローンの処置方法、 α ウイルスの cDNA 及び RNA の形質移入方法及び α ウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0200】

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. および 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 の翻訳を阻止するように設計することができる。

【0201】

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、NTT をコードする配列のヌクレオチド鎖切断を、特異的且つ効果的に触媒する組換え型のハンマーヘッド型リボザイム分子が含まれる。

【0202】

任意の RNA 標的内の特異的リボザイム切断部位を、GUA、GUU、GUC 配列を含めたリ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する。一度同定すると、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。

【0203】

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、固相フォスフォア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、NTT 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取り込むことが可能である。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。

【0204】

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ロチオネートまたは 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

10

20

30

40

50

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の他、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*) 等を加えることができる。

【0205】

本発明の更なる実施例は、NTTをコードするポリヌクレオチドの発現の変化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、NTT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、NTTをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、NTT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、NTT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。

10

【0206】

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。NTT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露して得る。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、無細胞再構成系または再構成生化学系があり得る。NTTをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で周知の任意の方法でアッセイする。通常、NTT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、特定の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つ以上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) 。

20

30

40

【0207】

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送達は、当分野でよく知られている方法を用いて実行するこ

50

とができる (Goldman, C. K. ら (1997) Nat. Biotechnol. 15: 462 - 466. 等を参照)。

【0208】

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。

【0209】

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。様々な処方が通常知られており、詳細は Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA) の最新版に記載されている。このような組成物は、NTT、NTTの抗体、擬態、アゴニスト、アンタゴニスト、またはNTTのインヒビターなどからなる。

10

【0210】

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。

【0211】

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量有機薬) の場合には、速効製剤のエアロゾル送達は今分野で公知である。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送達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)。肺送達は、針注射なしに投与する点で優れており、有毒な可能性のある浸透エンハンサーの必要性をなくす。

20

【0212】

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。

【0213】

NTT またはその断片を含む高分子を直接細胞内に送達するべく、特殊な形態に組成物が調製されるのが好ましい。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送達を促進し得る。別法では、NTT またはその断片を HIV Tat-1 タンパク質の陽イオン 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)。

30

【0214】

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。

40

【0215】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえば NTT またはその断片、NTT の抗体、NTT のアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。治療有効度及び毒性は、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 ED₅₀ (集団の 50% の医薬的有效量) または LD₅₀ (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。毒性効果の薬用効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀ / ED₅₀ 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

50

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、 ED_{50} 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。

【0216】

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、患者の通常の状態、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。

10

【0217】

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。特定の投与量及び送達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送達は、特定の細胞、状態、位置等に特異的なものとなる。

【0218】

20

(診断)

別の実施例では、NTTに特異的に結合する抗体が、NTTの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはNTTやNTTのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビター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用いられる。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。NTTの診断アッセイには、抗体及び標識を用いてヒトの体液或いは細胞や組織から採取されたものからNTTを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものもされていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

30

【0219】

NTTを測定するためのELISA,RIA,及びFACSを含む種々のプロトコルは、当分野では周知であり、変わった或いは異常なレベルのNTTの発現を診断する元となるものを提供する。正常或いは標準的なNTT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NTT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。被験者、対照及び疾患の生検組織からのサンプルのNTTの発現の量が基準値と比較される。基準値と被験者との偏差が疾患を診断するパラメータとなる。

【0220】

40

本発明の別の実施例によれば、NTTをコードするポリヌクレオチドを診断のために用いることもできる。用い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。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るNTTを発現する生検組織における遺伝子の発現を検出し定量する。この診断アッセイを用いて、NTTの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のNTT値の調節を監視する。

【0221】

一実施形態では、NTTまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、NTTをコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば5'調節領域である高度に

50

特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントは、プローブがNTTをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【0222】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、NTTをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。

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: 7-10の配列、或いはNTT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

【0223】

NTTをコードするDNAに対して特異的なハイブリダイゼーションプローブの作製方法には、NTT及びNTT誘導体をコードするポリヌクレオチド配列をmRNAプローブの作製のためのベクターにクローニングする方法がある。mRNA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RNA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、*in vitro*でRNA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。

20

【0224】

NTTをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、NTTの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないが、こうした疾患としては、運動不能症、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、嚢胞性線維症、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面神経麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病、糖尿病、尿崩症、糖尿病性ニューロパシー、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、高カリウム周期性四肢麻痺、正常カリウム周期性四肢麻痺、パーキンソン病、悪性高体温症、多剤耐性、重症筋無力症、筋強直性ジストロフィー、緊張病、遅発性ジスキネジー、ジストニー、末梢神経障害、脳腫瘍、前立腺癌等の輸送疾患、例えば狭心症、徐脈、頻脈、高血圧、Long QT症候群、心筋炎、心筋症、ネマリンミオパシー、中心核ミオパシー、脂質ミオパシー、ミトコンドリアミオパシー、甲状腺毒素ミオパシー、エタノールミオパシー、皮膚筋炎、封入体筋炎、感染性筋炎、多発性筋炎のような輸送に関連する心臓疾患、例えばアルツハイマー病、記憶喪失、双極性障害、痴呆、鬱病、癲癇、トゥーレット病、妄想型精神分裂病、および精神分裂病のような輸送に関連する神経疾患、および、例えば神経線維腫症、ヘルペス後神経痛、三叉神経障害、サルコイドーシス、鎌状赤血球貧血、ウィルソン病、白内障、不妊症、肺動脈狭窄、感音常染色体難聴、高血糖症、低血糖症、グレーヴズ病、甲状腺腫、クッシング病、アジソン病、グルコース・ガラクトース吸収不良症候群、高コレステロール血症、副腎脳白質ジストロフィー、ゼルウィガー症候群、Menkes病、後角症候群、von Gierke病、シスチン尿症、イミノグリシン尿症、Hartup病、およびファンコーニ病のようなその他の輸送に関連する疾患、癲癇、虚血性脳血管疾患、脳卒中、脳腫瘍、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病その他の錐体外路系疾患、筋萎縮性側索硬化症その他の運動ニューロン疾患、進行性神経性筋萎縮症、網膜色素変性症、遺伝性運動失調症、多発性硬化症その他の脱髄疾患、バクテリア性及びウィルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎および神経根炎、ウィルス性中枢神経疾患、プリオン病（クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン症候群、及びGerstmann-Strausler-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性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、

30

40

50

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、妄想型精神分裂病、ヘルペス後神経痛、トゥレット病、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性痴呆等の神経疾患、急性ストレス疾患、アルコール依存症、アンフェタミン依存症、拒食症、非社会性人格障害、注意欠陥多動性障害、自閉症、不安症、回避的人格障害、双極性障害、境界性人格障害、短期的な精神異常、神経性大食症、大麻依存症、コカイン依存症、行為障害、気分循環性障害、精神錯乱、妄想性障害、痴呆、依存性人格障害、鬱病、気分変調性障害、幻覚剤依存症、演技性人格障害、吸入物依存症、躁鬱病、多発脳梗塞性痴呆、自己愛性人格障害、ニコチン依存症、強迫神経症、オピオイド依存症、反抗性障害、パニック障害、妄想性人格障害、フェンシクリジン依存症、恐怖症、心的外傷後ストレス障害、分裂病性感感情障害、分裂性人格障害、精神分裂症、鎮静剤依存症、分離不安障害、および睡眠障害等の精神疾患が含まれる。NTTをコードするポリヌクレオチド配列は、サザーン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック（dipstick）、ピン（pin）、ELISA式アッセイ、及び変異NTTの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。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。

10

20

30

40

50

【0225】

ある実施態様では、NTTをコードするヌクレオチド配列は、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有用であろう。NTTをコードするヌクレオチド配列は、標準的な方法で標識化され、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或いは組織のサンプルに加えることができるであろう。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。患者のサンプルのシグナルの量が、対照サンプルと較べて著しく変わっている場合は、サンプル内のNTTをコードするヌクレオチド配列の変異レベルにより、関連する疾患の存在が明らかになる。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。

【0226】

NTTの発現に関連する疾患の診断の基準となるものを提供するために、発現の正常すなわち標準的なプロファイルが確立される。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、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、NTTをコードする配列或いはその断片とを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。

【0227】

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ペ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。

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、実際に臨床的症状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。

【0228】

N T T をコードする配列から設計されたオリゴヌクレオチドのさらなる診断への利用には、P C Rの利用が含まれ得る。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N T Tをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはN T Tをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。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。

【0229】

或る実施態様において、N T T 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、一塩基多型 (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、S S C P (*s i n g l e - s t r a n d e d c o n f o r m a t i o n p o l y m o r p h i s m*) 及び蛍光S S C P (*f S S C P*) 法がある。S S C Pでは、N T T 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たポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) でD N Aを増幅する。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シーケンシング機などの高処理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ケ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、例えば高処理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。

【0230】

N T T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 .* 他 (1993) *J . I m m u n o l . M e t h o d s* 159:235244; *D u p l a a* , *C .* 他 (1993) *A n a l . B i o c h e m .* 212:229236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反応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。

【0231】

更に別の実施例では、本明細書で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エレメント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ィー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ィールに基づき、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。

【0232】

別の実施例では、N T T、N T Tの断片、N T Tに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエ

レメント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。

【0233】

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、所定の条件下で所定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される (Seilliamer 他、米国特許第 5,840,484 号の "Comparative Gene Transcript Analysis" を参照。この特許に言及することを以って
10
本明細書の一部とする)。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。

【0234】

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 in vivo、または株化細胞の場合には in vitro での遺伝子発現を反映する。
20

【0235】

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、in vitro 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シグネチャ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 (Nuwaysir, E. F. ら、(1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. および N. L. Anderson (2000) Toxicol. Lett. 112-113:467-471、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シグネチャと同一のシグネチャを有する場合には、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に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、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 2000 年 2 月 29 日に National Institute of Environmental Health Sciences より発行された Press Release 00-02 を参
30
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。
40

【0236】

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
50

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。

【0237】

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および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。

10

20

【0238】

プロテオームのプロファイルは、NTTに特異的な抗体を用いてPKIN発現レベルを定量することによっても作成可能である。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。

30

【0239】

プロテオームレベルでの毒性サイン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サイン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. および 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サインは有用たり得る。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。

40

【0240】

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。

【0241】

50

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反応を示す。

【0242】

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て本明細書の一部となす。

【0243】

本発明の別の実施例ではまた、NTT をコードする核酸配列を用いて、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なハイブリダイゼーションプローブを作製す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 (例えば、Harrington, J. J. 他 (1997) Nat. Genet. 15:345-355; Price, C. M. (1993) Blood Rev. 7:127134; and Trask, B. J. (1991) Trends Genet. 7:149154 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 (例えば、Lander, E. S. and D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357 を参照。)

蛍光原位置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, 965-968 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。物理的な染色体地図上の NTT 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が、このような疾患と関連する DNA 領域の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0244】

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置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、正確な染色体の遺伝子座がわ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疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、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、該領域に対する任意のマッピングにより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 (G a t t i , R . A . ら (1 9 8 8) N a t u r e 3 3 6 : 5 7 7 - 5 8 0 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。

【 0 2 4 5 】

本発明の別の実施例では、N T T、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに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。N T Tと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【 0 2 4 6 】

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 (G e y s e n , らの (1 9 8 4) P C T 出願番号 W O 8 4 / 0 3 5 6 4 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、N T T或いはその断片と反応させ、洗浄する。次ぎに、結合されたN T T が、当分野で周知の方法で検出される。精製されたN T T はまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。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。

【 0 2 4 7 】

別の実施例では、N T Tと結合可能な中和抗体がN T Tと結合するため試験用化合物と特に競合する、競合的薬剤スクリーニングアッセイを用いることができる。この方法では、抗体が、N T Tと1つ以上の抗原決定因子を共有するどのペプチドの存在も検出する。

【 0 2 4 8 】

別の実施例では、発展途上の分子生物学技術にN T Tをコードするヌクレオチド配列を用いて、限定はされないが、現在知られているトリプレット暗号及び特異的な塩基対相互作用などのヌクレオチド配列の特性に依存する新しい技術を提供することができる。

【 0 2 4 9 】

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。

【 0 2 5 0 】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第 6 0 / 2 0 5 , 5 1 8 号、第 6 0 / 2 1 3 , 9 5 6 号、第 6 0 / 2 1 5 , 1 0 5 号、第 6 0 / 2 1 8 , 9 4 7 号及び第 6 0 / 2 2 1 , 4 8 8 号は、言及することをもって本明細書の一部となす。

【 0 2 5 1 】

(実施例)

1 c D N A ライブラリの作製

I n c y t e c D N A 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) に記載された c D N A 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 T R I Z O L (L i f e T e c h n o l o g i e s) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムクッション上で遠心分離するかクロ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 R N A を沈殿させた。

【 0 2 5 2 】

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。

【0253】

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、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)を用いて本技術分野で公知の推奨方法または類似の方法で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)またはpINCY(Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto CA)等である。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DH5α、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含むコンピテント大腸菌細胞に形質転換した。

【0254】

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、実施例1のようにして得た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 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しないで4℃で保管した。

【0255】

別法では、高処理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 Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0256】

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

すようにシーケンシングした。cDNAのシーケンス反応は、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のシーケンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬またはABIシーケンシングキット、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のシーケ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シーケンシングシステム (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シーケンシングシステム (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。

10

【0257】

Incyte cDNA配列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)配列を除去し、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。例えば、Eddy, S. R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365を参照のこと)。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。引き続いて、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、MACDNA SIS 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 (DNASTAR) 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 (DNASTAR) 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。

20

30

40

【0258】

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

50

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 2 配列間の相同性が高くなる）。

【0259】

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: 7 - 12 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。

10

【0260】

4 ゲノム DNA からのコード配列の同定及び編集

推定神経伝達物質トランスポータは、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpr i 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. および 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、メチオニンから停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、30 kb に設定した。これらの Genscan 推定 cDNA 配列の内、どの配列が神経伝達物質トランスポータ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 モデルにおいて神経伝達物質トランスポータについて問合せて分析した。潜在的な神経伝達物質トランスポータが、神経伝達物質トランスポータ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 gbpr i 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。

20

30

【0261】

5 ゲノム配列データの cDNA 配列データへのアセンブリ

40

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

50

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 gbpr i 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。

10

【0262】

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。まず、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構築された部分 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。

20

【0263】

6 NTT 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: 7 - 12 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: 7 - 12 と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表 7) などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスターに組み入れた。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、クラスター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ー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ーの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

30

【0264】

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、1 cM 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、配列が各クラスター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 Genethon 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>) などの一般個人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。

40

【0265】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

50

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、特定の細胞種または組織からのRNAが結合される膜への標識されたヌクレオチド配列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, F.M.ら, 4章及び16章等を参照。)

【0266】

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 Pharmaceuticals)等のヌクレオチド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、多数膜系ハイブリダイゼーションよりも非常に速い。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。 10

【数1】

(BLASTスコア×配列一致率)

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

【0267】

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(ギャップにより隔離され得る)。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100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。 20 30

【0268】

或いは、NTTをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。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構築される。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、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、または尿管などの生物/組織のカテゴリーの一つに分類される。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。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。得られるパーセンテージは、NTTをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース(Incyte Genomics, Palo Alto CA)から得ることができる。 40

【0269】

8 NTTをコードするポリヌクレオチドの伸長

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 50

るべく合成した。開始プライマーは、長さが約 22 ~ 30 ヌクレオチド、GC 含有率が約 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、OLIGO 4.06 ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNA 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伸長は全て回避した。

配列を伸長するために、選択されたヒト cDNA 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テッドセットを設計した。

【0270】

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 PCR 法によって得られた。PCR は、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) 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 (Amersham Pharmacia Biotech)、ELONGASE 酵素 (Life Technologies)、Pfu DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を含む。プライマーの組、PCI A と PCI 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 , 3 分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 60 , 1 分、ステップ 4: 68 , 2 分、ステップ 5: ステップ 2、3 および 4 を 20 回反復する。ステップ 6: 68 , 5 分、ステップ 7: 4 で保存する。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 , 3 分、ステップ 2: 94 , 15 秒、ステップ 3: 57 , 1 分、ステップ 4: 68 , 2 分、ステップ 5: ステップ 2、3 および 4 を 20 回反復する。ステップ 6: 68 , 5 分、ステップ 7: 4 で保存する。

【0271】

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 PICO GREEN 定量試薬 (0.25 (v/v) PICO GREEN; Molecular Probes, Eugene OR) を不透明な蛍光光度計プレート (Coming Costar, Acton MA) 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 Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) 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。

【0272】

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。ショットガン・シーケンシングのために、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、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 で一晚培養した。

【0273】

細胞を溶解して、Taq DNA ポリメラーゼ (Amersham Pharmacia

B i o t e c h) 及び P f u D N A ポリメラーゼ (S t r a t a g e n e) を用いて以下の手順で D N A を P C R 増幅した。ステップ 1 : 9 4 , 3 分、ステップ 2 : 9 4 , 1 5 秒、ステップ 3 : 6 0 , 1 分、ステップ 4 : 7 2 , 2 分、ステップ 5 : ステップ 2、3 および 4 を 2 9 回反復する。ステップ 6 : 7 2 , 5 分、ステップ 7 : 4 で保存する。上記したように P I C O G R E E N 試薬 (M o l e c u l a r P r o b e s) で D N A を定量化した。D N A 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 2 0 % ジメチルスルホキシド (1 : 2 , v / v) で希釈し、D Y E N A M I C 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 D Y E N A M I C D I R E C T k i t (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) または A B I P R I S M B I G D Y E ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット (T e r m i n a t o r c y c l e s e q u e n c i n g r e a d y r e a c t i o n k i t) (A p p l i e d B i o s y s t e m s) を用いてシークエンシングした。

10

【0274】

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。

【0275】

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

S E Q I D N O : 7 - 1 2 から得たハイブリダイゼーションプローブを利用して、c D N A、ゲノム D N A または m R N A をスクリーニングする。約 2 0 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、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) のような最新式のソフトウェアを用いてデザインし、5 0 p m o l の各オリゴマーと、2 5 0 μ C i の [γ - 32 P] アデノシン三リン酸 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h)、) 及び T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (D u P o n t N E N、B o s t o n M A) とを組み合わせるにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、S E P H A D E X G - 2 5 超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビードカラム (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて十分に精製する。A s e I、B g l I I、E c o R I、P s t I、X b a I または P v u I I (D u P o n t N E N) 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 D N A 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 1 0 7 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。

20

30

【0276】

各消化物から得た D N A は、0 . 7 % アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (N y t r a n P l u s , S c h l e i c h e r & S c h u e l l , D u r h a m N H) に移す。ハイブリダイゼーションは、4 0 で 1 6 時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば 0 . 1 $\times$ 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ー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。

40

【0277】

1 0 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 B a l d e s c h w e i l e r 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 (S c h e n a (1 9 9 9) 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

50

ット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線の、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 (S ch e n a , M . ら (1 9 9 5) S c i e n c e 2 7 0 : 4 6 7 - 4 7 0 、 S h a l l o n . D . ら (1 9 9 6) G e n o m e R e s . 6 : 6 3 9 - 6 4 5 、 M a r s h a l l , A . および J . H o d g s o n (1 9 9 8) N a t . B i o t e c h n o l . 1 6 : 2 7 - 3 1 . を参照)。

【0278】

完全長 c D N A 、発現配列タグ (E S T) 、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と成り得る。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 G E N E ソフトウェア (D N A S T A R) 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抱合される。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。

【0279】

組織または細胞サンプルの調製

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 R N A を単離し、オリゴ (d T) セルロース法を用いてポリ (A) ⁺ R N A を精製する。各ポリ (A) ⁺ R N A サンプルは、M M L V 逆転写酵素、0 . 0 5 p g / μ l のオリゴ (d T) プライマー (2 1 m e r) 、 1 × 第 1 鎖緩衝液、0 . 0 3 u n i t / μ l の R N A ザーゼ阻害因子、5 0 0 μ M の d A T P 、 5 0 0 μ M の d G T P 、 5 0 0 μ M の d T T P 、 4 0 μ M の d C T P 、 4 0 μ M の d C T P - C y 3 (B D S) または d C T P - C y 5 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて逆転写する。逆転写反応は、G E M B R I G H T キット (I n c y t e) を用いてポリ (A) ⁺ R N A 含有の 2 5 体積 m l 内で行う。特異的対照ポリ (A) ⁺ R N A は、非コード酵母ゲノム D N A から i n v i t r o 転写により合成する。各反応サンプル (1 つは C y 3 、もう 1 つは C y 5 標識) は、2 . 5 m l の 0 . 5 M 水酸化ナトリウムで処理し、8 5 0 ° C で 2 0 分間インキュベートし、反応を停止させて R N A を分解させる。サンプルは、2 つの連続する C H R O M A S P I N 3 0 ゲル濾過スピンカラム (C L O N T E C H L a b o r a t o r i e s , I n c . (C L O N T E C H) , P a l o A l t o C A) を用いて精製する。結合後、2 つの反応サンプルは、1 m l のグリコーゲン (1 m g / m l) を用いて析出させたエタノール、6 0 m l の酢酸ナトリウム及び 3 0 0 m l の 1 0 0 % エタノールである。サンプルは次に、S p e e d V A C (S a v a n t I n s t r u m e n t s I n c . , H o l b r o o k N Y) を用いて乾燥して仕上げ、1 4 μ l の 5 × S S C / 0 . 2 % S D S 中で再懸濁する。

【0280】

マイクロアレイの調製

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 c D N A 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。P C R 増幅は、c D N A 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。3 0 サイクルの P C R で 1 ~ 2 n g の初期量から 5 μ g 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、S E P H A C R Y L - 4 0 0 (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて精製される。

【0281】

10

20

30

40

50

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 0.1% の SDS 及びアセトン中で超音波をかけ、蒸留水で非常に良く洗って洗浄する。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 のオブンで硬化させる。

【0282】

米国特許第 5,807,522 号に記載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。この特許に引用することを以て本明細書の一部とする。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。

【0283】

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 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。

【0284】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、5 × SSC, 0.2% SDS ハイブリダイゼーション緩衝液中の Cy3 及び Cy5 標識した cDNA 合成生成物を各 0.2 μg 含む 9 μl のサンプル混合体を有する。サンプル混合体は、65 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空洞を有する防水チェンバーに移す。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 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 で 10 分間洗浄し、第 2 洗浄緩衝液中 (0.1 × SSC) において 45 で 10 分間各々 3 度洗浄して乾燥させる。

【0285】

検出

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 488 nm、Cy5 の励起のためには 632 nm でスペクトル線を発生し得る Innova 70 混合ガス 10 W 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の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御の X-Y ステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いた 1.8 cm × 1.8 cm のアレイは、20 μm の解像度でスキャンした。

【0286】

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。発光された光は、波長に基づき分離され、2 つの蛍光色素に対応する 2 つの光電子増倍管検出器 (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) に送られる。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ーする。用いる蛍光色素の最大発光の波長は、Cy3 では 565 nm、Cy5 では 650 nm 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、蛍光色素1つにつき1度スキャンし、各アレイを通常2度スキャンする。

【0287】

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較正する。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。異なる源泉(例えば試験される細胞及び対照細胞など)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、その較正を、2つの蛍光色素で較正するcDNAのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合体に各々等量を加えることによって行う。

10

【0288】

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-ディジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてディジタル化される。ディ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間の光学的クロストーク(発光スペクトルの重なりに起因する)を補正する。

20

【0289】

グリッドが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。

【0290】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

NTT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な配列は、天然のNTTの発現を低下させるため即ち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)及びNTTのコーディング配列を用いて、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、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがNTTをコードする転写物に結合するのを阻害する。

30

【0291】

1.2 NTTの発現

NTTの発現及び精製は、細菌若しくはウイルスを基にした発現系を用いて行うことができる。細菌でNTTが発現するために、抗生物質耐性及びcDNA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cDNAをサブクロニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)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、BL21(DE3)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β-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとNTTを発現する。真核細胞でのNTTの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多角体病ウイルス(ACMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須の多角体遺伝子を、相同組換え或いは転移プラスミドの媒介を伴う細菌の媒介による遺伝子転移のどちらかによって

40

50

、NTT をコードする cDNA と置換する。ウイルスの感染力は維持され、強い多角体プロモーターによって高いレベルの cDNA 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 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) 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)。

【0292】

殆どの発現系では、NTT が、例えばグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST)、または FLAG や 6-His などのペプチドエピトープ標識で合成された融合タンパク質となるため、未精製の細胞溶解物からの組換え融合タンパク質の親和性ベースの精製が素早く 1 回で行うことができる。GST は日本住血吸虫からの 26 kDa 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 (Amersham Pharmacia Biotech)。精製の後、GST 部分を特定の操作部位で NTT からタンパク質的に切断できる。FLAG 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 FLAG 抗体 (Eastman Kodak) 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-His は、金属キレート樹脂 (QIAGEN) 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 Ausubel (1995) 10 章、16 章に記載されている。これらの方法で精製した NTT 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。

【0293】

1.3 機能的アッセイ

NTT の機能は、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 NTT をコードする配列の発現によって評価する。cDNA を、cDNA 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ニングする。選り抜きのベクターには、pCMV SPORT プラスミド (Life Technologies) 及び pCR 3.1 プラスミド (Invitrogen) 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 µg 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 µg 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、cDNA 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° 側方光散乱によって計測される細胞サイズと顆粒状性の変化、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。

【0294】

遺伝子発現における NTT の影響は、NTT をコードする配列と CD64 または CD64

- G F P のどちら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。C D 6 4 または C D 6 4 - G F P 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 (I g G) の保存領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒト I g G が C D 6 4 に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる (D Y N A L . L a k e S u c c e s s . N Y) 。 m R N A は、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。N T T 及び目的の他の遺伝子をコードする m R N A の発現は、ノーザン分析やマイクロアレイ技術で分析することができる。

【 0 2 9 5 】

1 4 N T T 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 (P A G E ; 例えば、H a r r i n g t o n , M . G . (1 9 9 0) M e t h o d s E n z y m o l . 1 8 2 : 4 8 8 - 4 9 5 を参照) または他の精製技術で実質的に精製された N T T を用いて、標準的なプロトコルでウサギを免疫化して抗体を作り出す。

【 0 2 9 6 】

別法では、N T T アミノ酸配列を L A S E R G E N E ソフトウェア (D N A S T A R) を用いて解析して免疫原性の高い領域を決定し、対応するオリゴペプチドを合成してこれを用いて当業者に周知の方法で抗体を生産する。C 末端付近の、或いは隣接する親水性領域内のエピトープなどの適切なエピトープの選択については、当分野で周知である (例えば、前出の A u s u b e l , 1 9 9 5 , 1 1 章を参照) 。

【 0 2 9 7 】

通常は、長さ約 1 5 残基のオリゴペプチドを、F m o c ケミストリを用いる A B I 4 3 1 A ペプチドシンセサイザ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 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 (M B S) を用いた反応によって K L H (S i g m a - A l d r i c h , S t . L o u i s M O) に結合させて、免疫抗原性を高める (前出の A u s u b e l , 1 9 9 5 等を参照) 。完全フロイントアジュバントにおいてオリゴペプチド - K L M 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抗 N T T 活性を検査するには、ペプチドまたは N T T を基板に結合し、1 % B S A を用いてブロッキング処理し、ウサギ抗血清と反応させて洗浄し、さらに放射性ヨウ素標識されたヤギ抗ウサギ I g G と反応させる。

【 0 2 9 8 】

1 5 特異的な抗体を用いる天然 N T T の精製

天然或いは組換え N T T を、N T T に特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィー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、C N B r - 活性化 S E P H A R O S E (A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h) のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗 N T T 抗体とを共有結合させることにより形成する。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。

【 0 2 9 9 】

N T T を含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、N T T を優先的に吸着できる条件で (例えば、界面活性剤の存在下において高イオン強度のバッファーで) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体と N T T との結合を切るような条件で (例えば、p H 2 ~ 3 のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピック塩で) 溶出させ、N T T を回収する。

【 0 3 0 0 】

1 6 N T T と相互作用する分子の同定

N T T または生物学的に活性である N T T 断片を、^{1 2 5} I ボルトンハンター試薬で標識する。 (例えば B o l t o n A . E . a n d W . M . H u n t e r (1 9 7 3) B i o c h e m . J . 1 3 3 : 5 2 9 - 5 3 9 を参照。) マルチウェルプレートに予め配列しておいた候補の分子を、標識した N T T と共にインキュベートし、洗浄して、標識した N T T 複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々な N T T 濃度で得られたデ

10

20

30

40

50

ータを用いて、候補分子と結合したNTTの数量及び親和性、結合についての値を計算する。

【0301】

別法では、NTTと相互作用する分子を、Fields, S. 及びO. Song (1989, Nature 340: 245 - 246) に記載の酵母2 - ハイブリッドシステム (yeast two - hybrid system) やMATCHMAKERシステム (Clontech) などの2 - ハイブリッドシステムに基づいた市販のキットを用いて分析する。

【0302】

NTTはまた、ハイスループット型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHC ALLINGプロセス (CuraGen Corp., New Haven CT) に用いて、遺伝子の2つの大きなライブラリによってコードされるタンパク質間の全ての相互作用を決定することができる (Nandabalan, K. 他 (2000) 米国特許第6,057,101号)。

【0303】

17 NTTの活性の実証

NTTの活性測定はトレーサーフラックスと電気生理学的アプローチによって行なわれる。トレーサーフラックスは、アフリカツメガエル卵母細胞への標識された基質の取り込みによって実証される。

ステージ5及び6における卵母細胞は、NTT mRNA (卵母細胞あたり10 ng) で注入され、OR2培地 (82.5 mMのNaCl、2.5 mMのKCl、1 mMのCaCl₂、1 mMのMgCl₂、1 mM Na₂HPO₄、5 mMのHepes、3.8 mMのNaOH、50 µg/ml ゲンタマイシン、pH 7.8) 内で摂氏18度で3日間インキュベートされ、NTTの発現を可能とする。卵母細胞は、次に標準取り込み培地 (100 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのCaCl₂、1 mMのMgCl₂、10 mMのHepes/Tris、pH 7.5) へと移される。神経伝達物質の取り込みは卵母細胞に³H基質を加えることによって開始される。30分間のインキュベートの後、取り込みは卵母細胞をNa⁺のない培地内で3回洗浄することで終了し、取り込まれた³Hの量を測定し、対照と比較する。NTT活性は内部移行された³H基質のレベルに比例する。

【0304】

別方法として、NTTの活性をの電気生理学的アッセイを使って、イオンコンダクタンスを測定して実証することもできる。T7ポリメラーゼで転写され、キャッピングされたNTT mRNAを上記に似た卵胞をくずしたステージ5のアフリカツメガエル卵母細胞に注入する。2～7日後、2電極ボルテージクランプ法により輸送を測定する。2電極ボルテージクランプ法は保持電圧50 mVで行なわれる。データは10 Hzでフィルタリングされ、MacLabデジタルアナログコンバータおよびデータ収集解析用のソフトウェア (AD Instruments, Castle Hill, Australia) により記録される。NTTの外部イオンに対する依存性を調べるために、ナトリウムをコリンまたはNメチルDグルコサミンで置き換え、塩素イオンをグルコン酸、NO₃, またはSO₄で置き換えることができる (Kavanaugh, M.P. 他 (1992) J. Biol. Chem. 267: 22007-22009)。

【0305】

別方法として、NTTのコリン輸送活性またはコリントランスポータ様CTL1タンパク質活性を、NTTをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換した酵母によるコリンの取り込み測定によって求める。アッセイは25 nM [³H]コリン存在下の無窒素培地において30分で10分または30分行なわれる。細胞はそれからフィルタリングされ、洗浄される。細胞内の [³H]コリンの量は細胞内のNTT活性に比例する (前出のO'Regan, S.)。

【0306】

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。

【0307】

(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

【0308】

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。

【0309】

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。

【0310】

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。

20

【0311】

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。

【0312】

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。

【0313】

表7は、NTT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。

【表1】

30

表1

Incyte プロジ ェクト ID	ポリペプチドSEQ NO:	ID	Incyte ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチドID
7617689	1	7617689CD1	7	7617689CB1
6881669	2	6881669CD1	8	6881669CB1
2742486	3	2742486CD1	9	2742486CB1
71556695	4	71556695CD1	10	71556695CB1
7472800	5	7472800CD1	11	7472800CB1
7475553	6	7475553CD1	12	7475553CB1

10

20

30

40

表2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	塩基配列	GenBank 相関体
1	7617689CD1	G202523	0	[ラット] GABA トランスポート (Borden, L.A. 他 (1992) J. Biol. Chem. 267, 21098-21104)
2	6881669CD1	G298324	0	[ラット] ナトリウム依存性神経伝達物質 (Uhl, G.R. 他 (1992) Brain Res. Mol. Brain Res. 16 (3-4), 353-359)
3	2742486CD1	G1314290	2.10E-19	[ヒト] 小脳体モノアミントランスポート VMAT1 (Erickson, J.D. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (10), 5166-5171)
4	71556695CD1	G799339	0	[ヒト] タウリントランスポート (Miyamoto, Y. 他 (1996) Curr. Eye Res. 15 (3), 345-349)
5	7472800CD1	G181656	0	[ヒト] ドーパミントランスポート (Vandenbergh, D.J. 他 (1992) Brain Res. Mol. Brain Res. 15 (1-2), 161-166)
6	7475553CD1	G914028	5.70E-300	[ラット] 神経伝達物質 rB21a (Smith, K.B. 他 (1995) FEBS Lett. 357 (1), 86-92)

表3-1

SEQ ID NO:	inexyte ド ID	ポリメチ アミ、酸、糖基 数	潜在のリン酸化部位	潜在的グリコ シ化部位	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	7617689CD1	602	S10 T596 T525 T230 T555 T587	N169 N173 N178 N269	膜貫通ドメイン: N126-W150 S325-Q341 F371-S390 V426-L445 M454-G472 ナトリウム: 神経伝達物質シンボータファミリ(SNF): R32-P570 ナトリウム: 神経伝達物質シンボータファミリ(ナリ) BL00610:E40-E89, W104-Q153, W206-G257, R272-T324, A365-P407, S464-L518, Y524-P546 ナトリウム: 神経伝達物質シンボータファミリ(ナリ) N36-T90 ナトリウム/神経伝達物質シンボータファミリ PR00176:E40-L61, A69-L88, G113-Y139, Y233-P250, 1315-I335, I 369-L 388, G453-A473, K493-I513	HMMER
						HMMER PFAM
						BLIMPS BLOCKS
						PROFILESCAN
						BLIMPS PRINTS

表3-2

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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
1					トランスポート 神経伝達分子 シンボータ糖タンパク 塩化ナトリウム依存 GABA PD000448:R32-P570 膜貫通 トランスポート タンパク質 トランスポーター アミノ酸ペルミイゼ 糖タンパク質 膜 PD000214:A258-P548 塩化ナトリウム依存 GABA トランスポーター 神経伝達物質 糖タンパク質 シンボータ 多重膜伝子 PD037836:T555-G602	BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM
2	6881669CD1	730	S129 S137 S19 S217 S25 S250 S425 S55 S699 T191 T287 T399 T489 T49 T522 T656 Y614	N187 N213 N276 N383 N394	ナトリウム 神経伝達物質 シンボータファミリー DM00572 P31646 22-576E22-R677 DM00572 P31649 22-576E22-R577 DM00572 P48066 40-598K24-R577 DM00572 P27799 26-581E22-Q576 ナトリウム 神経伝達物質 シンボータファミリーシグネチャ1: W56-F70 ナトリウム 神経伝達物質 シンボータファミリーシグネチャ2: Y139-T159 膜貫通ドメイン: L100-L117, V335-K359, S460-V483, K494-F512, M572-V589, L619-R640 ナトリウム: 神経伝達物質 シンボータファミリー: R61-R659 ナトリウム: 神経伝達物質 シンボータファミリー BL00610:Q69-E118, W133-C182, W226-G277, I292-T344, A449-K491, N541-S595, L612-P634	BLAST_DOMO MOTIFS MOTIFS HMMER HMMER PFAM BLIMPS_BLOCKS

【 表 5 】

10

20

30

40

表3-3

SEQ ID NO.	Inoite ポリパチ D ID	アミノ酸残基数	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					ナトリウム: 神経伝達物質 シンボータ ファミリーシグナチャ: N65-L119 ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ シグナチャ PR00176:Q69-L90, A98-L117, G142-Y168, I253-I270, V335-V355, F453-L472, T530-I550, Y570-V590 トランスボータ 神経伝達分子 シンボータ 糖タンパク 塩化ナトリウム依存 GABA PD000448:L423-R640, R61-F353 塩化ナトリウム依存 トランスボータ 神経伝達物質 トランスボータ NTT4 NTT73 PD03783:N651-D724 ナトリウムと塩化イオン依存 トランスボータ NTT3 神経伝達物質 トランスボータ シンボータ PD113985:M1-E60 塩化ナトリウム依存 トランスボータ 神経伝達物質 シンボータ NTT4 NTT73 PD03783:K359-E417 ナトリウム: 神経伝達物質 シンボータ ファミリー DM00572:Q0849:51-678:E52-G679 DM00572:P31662:50-676:E52-I677 DM00572:S50998:19-616:E56-V636 DM00572:A48716:183-762:S200-N361 ナトリウム: 神経伝達物質 シンボータ ファミリーシグナチャ Na_Neurotran_Symp.1 W65-V60	PROFLESCAN BLUMPS_PRINTS BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_PRODOM BLAST_DOMO MOTIFS

表3-4

SEQ ID NO.	inexor peptide ID	アミノ酸残基数	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	2742486CD1	523	S503 T52 S88 T420 S510 T511 S9 S49 S362 S498		小胞体/アミントランスポートとの類似性 PD075879; E287-H394	BLAST-PRODOM
					小胞体/エンドメイン DM03018 P54219 72-524; M199-E512	BLAST-DOMO
					膜貫通ドメイン: F168-L187, F265-L283, L399-1418	HMMER
4	71556695CD1	649	S23 T57 S75 T140 T312 S351 S442 T610 S74 T204 S244 T271 S351 T610	N192 N208 N219 N562	ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー BL00610; D78-E127, W142-C191, W247-G298, R313-T365, A406-P448, C505-L559, Y565-P587	BLIMPS-BLOCKS
					ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー DM00572 P31649 22-576; Q69-E613	BLAST-DOMO
					ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー-シグネチャ neurotransm_transp_1.prf: S74-I128	PROFESCAN
					ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー-シグネチャ PR00176; D78-L99, A107-L126, G151-Y177, Y274-V291, M356-I376, M410-L429, G494-G514, K534-V554	BLIMPS-PRINTS
					トランスポート 神経伝達物質 トランスポート 膜貫通 シンボータ糖タンパク 塩化ナトリウム依存 GABA PD000448; R70-P611	BLAST-PRODOM
					ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー DM00572 Q00589 31-588; E60-A618	BLAST-DOMO
					ナトリウム/神経伝達物質 シンボータ ファミリー-シグネチャ Na_Neurotran_Symp_1; W94-F108	MOTIFS
					Na_Neurotran_Symp_2; Y177-T197	

10

20

30

40

表3-5

SEQ ID NO.	Incyte ID	ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
4						膜貫通ドメイン: L109-I128, I418-V436, V495-G513, S536-L553 ナトリウム:神経伝達物質 シンボータファミリー-SNF; R70-P611	HMMER HMMER-PFAM
5	7472800CD1		625	S197 S262 S53 S583 T476 T485 T538 T610	N181 N188 N205	膜貫通ドメイン: L103-F123, I146-T173, A409-A426, F451-N469 ナトリウム:神経伝達物質 シンボータファミリー; R60-G386 W410-P594 ナトリウム:神経伝達物質 シンボータファミリー BL00610D68-E117, V131-C180, W238-G289, R304-T356, P400-Q442, T489-P543, Y548-P570 ナトリウム:神経伝達物質 シンボータファミリー-シグネチャ; G64-L118 ナトリウム/神経伝達物質 シンボータシグネチャ PR00176D68-L89, A97-M116, G140-Y166, V265-L282, I347-F367, S404-I423, R518-V538 トランスボータ 神経伝達分子 シンボータ糖タンパク質塩化ナトリウム依存 GABA PD000448 R60-P594 ナトリウム依存 トランスボータ DADAT 神経伝達物質 シンボータ PD023333 M1-D59 膜貫通 トランスボータ タンパク質 ペルミタール-ゼアミノ酸 糖タンパク質 膜 PD00002141 244-L515, L453-K576, W238-S333, V145-S186	HMMER HMMER-PFAM HMMER HMMER-PFAM BLIMPS_BLOCKS PROFILES CAN BLIMPS_PRINTS BLAST_PROD OM BLAST_PROD OM

10

20

30

40

表3-6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	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
5					ナトリウム：神経伝達物質 シンボータ ファミリー DM00572 P27922 49-600N49-D597 DM00572 P51143 44-598E56-V601 DM00572 P31652 69-620D59-L600 DM00572 P51905 64-612V55-E595 ナトリウム：神経伝達物質 シンボータ ファミリー-シグネチャ Na ₂ Neurotran, Symp. 1 W84-F98 Na ₂ Neurotran, Symp. 2 Y166-S186	BLAST, DOMO MOTIFS
6	7475653CD1	592	S116 S159 S264 S314 S331 S362 T133 T192 T229 T497 T533	N131 N357	膜貫通ドメイン： Y83-N103, L174-T199, I277-I297, S392-L415, M509-Y524 ナトリウム：神経伝達物質 シンボータ ファミリー： R5-T303, C358-Q580 ナトリウム：神経伝達物質 シンボータ ファミリー-シグネチャ： A9-L63 ナトリウム：神経伝達物質： BL00610: W77-C126, W168-G219, Q234-T286, A381-I423, T477-T531, K549-P571, Q13-E62 ナトリウム：神経伝達物質： PR00176: Q13-L34, S42-L61, G86-Y112, V195-I212, I277-I297, M385-I404, T466-L486, K506-S526	HMMER HMMER-PFAM ProfileScan BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS

40

【表 10】

表4-1

ポリヌクレオチドSEQ ID NO:	Incyte ヌクレオチドID	ポリ	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
7	7617689CB1		2168	1383-1520	5407696F6 (BRAMNOT01)	210	742
	7617689CB1		2168	1383-1520	70501086V1	1342	1949
	7617689CB1		2168	1383-1520	5407696F8 (BRAMNOT01)	204	711
	7617689CB1		2168	1383-1520	70505706V1	590	1263
	7617689CB1		2168	1383-1520	757515H1 (BRAITUT02)	1	222
	7617689CB1		2168	1383-1520	70501894V1	741	1381
8	7617689CB1		2168	1383-1520	70505220V1	1545	2168
	7617689CB1		2168	1383-1520	70501380V1	1369	1987
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	6290242H1 (EPIPUNA01)	483	616
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	7136875H1 (BMARTXR02)	580	1179
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	GBI:96881669_edit	113	868
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	4761061F8 (BRAMNOT01)	784	1392
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	7372128H2 (BRAIFEE04)	1	270
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	55045086H1	1328	1953
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	6914742F6 (PTUDIR01)	1836	2709
	6881669CB1		2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	2289873R6 (BRANON01)	1735	2174
9	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	4181117H1 (SINITUT03)	1	216
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	9820961 ()	2549	2958
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2896553F6 (KIDNTUT14)	1109	1730
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495			

10

20

30

40

表4-2

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ヌクレオチド ID	ポリ	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
10	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	7117217H1 (BRAHNOE01)	749	1245
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2419627R6 (SCORNO02)	1599	2161
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2419627T6 (SCORNO02)	2289	2949
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	55047291H1	533	839
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	5777360H1 (BRAINOT20)	2397	2950
11	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	55047293J1	163	836
	2742486CB1		2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	1398158F6 (BRAITUT08)	1791	2356
	71556695CB1		2135	1-261, 2048-2135	7685653H1 (BRADIK02)	1526	2135
	71556695CB1		2135	1-261, 2048-2135	7723816H1 (THYRDIE01)	1142	1484
	71556695CB1		2135	1-261, 2048-2135	9799338 CD	273	2135
12	71556695CB1		2135	1-261, 2048-2135	7641640H1 (SEMYTDR01)	504	1178
	71556695CB1		2135	1-261, 2048-2135	7620645H1 (HEARPER03)	1	587
	7472800CB1		1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	6866221H1 (BRAGNON02)	1	698
	7472800CB1		1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	FL7472800_g9108462_ g181656	120	1997
	7475553CB1		2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	FL7475553_g9702356_ g914028	1	1812

10

20

30

40

表4-3

ポリヌクレオチド SEQ ID NO.	Incyte ヌクレオチド ID	ポリ	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
	7475553CB1		2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	70646995V1)	2091	2774
	7475553CB1		2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71867729V1	1844	2494
	7475553CB1		2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441

10

20

30

40

表5

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	hexyte プロジェクト ID	代表的なタイプ
7	7617689CB1	BRAITUT02
8	6881669CB1	BRADIR02
9	2742486CB1	BRSTTUT14
10	71556695CB1	DRGTNOT01
11	7472800CB1	BRAGMON02
12	7475553CB1	BRAINOT09

10

20

30

40

表6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
BRAGNON02	pINCY	この標準化黒質組織ライブラリは黒質組織ライブラリの4.2.10e7の独立したクローンから作製した。開始RNAはアテローム性動脈硬化に起因する出血と胸大動脈破裂で死亡した81歳の白人女性から採取された黒質から単離したRNAから調製した。病理学検査では、双方の内部頸動脈に中度のアテローム性動脈硬化、前頭皮質および海馬に微視的な梗塞、および散在広汎性のアミロイド斑、および神経原線維結節が与られたが、これは年齢と矛盾しない。肉眼で見て、軟膜は上矢状静脈洞に沿った軽度の硝子質化と厚化が見られるのみであった。残りの軟膜は薄く、充血した血管がいくつか見られた。主に前頭極および前頭葉、及び前頭葉(双方)に軽度の萎縮が見られた。微視的には、アルツハイマータイプII星状細胞のペアが新皮質の深層にあった。中央前頭皮質の灰白質の奥深くのニューロンの周りでサテライトシス(satellitosis)が増大していた。黒質はまれな広汎性斑と神経原線維結節を含んでいた。後部海馬は反応性グリオシスに囲まれたヘモジリン含有マクロファージを伴う微視的な萎縮性の空洞化領域を含んでいた。患者の病歴は、敗血症、胆管炎、術後無気肺、肺炎、冠動脈疾患(CAD)、左心室肥大に起因する心肥大、巨脾症、肺動脈性腎硬化、結節性コロイド甲状腺腫、気腫、鬱血性心不全(CHF)、甲状腺機能低下症および抹消血管疾患を含んでいた。このライブラリは、極めて長時間(48時間/1回)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Scarses 他、PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他、Genome Research (1996) 6:791 を適応した条件を用いて2回にわたリノーマライズした。
BRABDT02	pINCY	ライブラリは脳血管事故死亡の57歳の白人男性の脳から除去した腫瘍小脳組織から単離したRNAを用いて作製した。血清検査は陰性だった。患者の病歴は、ハンチントン病、気腫およびタバコの乱用(40年間1日3〜4箱)などであった。
BRAINOT09	pINCY	ライブラリは妊娠23週で死亡の白人男子胎児から採取した脳組織から単離したRNAを用いて作製された。
BRAITUT02	PSPORT1	ライブラリは、58歳の白人男性の脳腫瘍病変の切除時、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。病理学検査では、グレード2の転移性副腎腫瘍が与られた。患者の病歴は、グレード2の腎細胞癌、不眠症および慢性的な気道閉塞などであった。家系には腎臓の悪性腫瘍が含まれている。

10

20

30

40

表6-2

ライブラリ	ベンダー	ライブラリの説明
BRSTTUT14	P1NCY	ライブラリは、62才の白人女性の片側性拡大単純乳房切除術時に採取した乳房腫瘍組織から増殖した RNA を用いて作製した。病理学検査は管状性グレード(4中)3、核グレード(3中)3の腺癌(管状型)を示した。管状癌腫(原位置、面胸型)が腫瘍重量の60%を占めていた。転移性の腺癌が(14)腋窩リンパ節(節周囲の拡張なし)のうちの1つで同定された。腫瘍細胞はエストロゲン受容体が強く陽性、プロゲステロン受容体が弱く陽性であった。患者の病歴は良性的直腸腫瘍、高脂質血症、不整脈、および肥満を含んでいた。家族歴はアテローム性硬心臓病、心筋梗塞、直腸癌、肺癌、および脳血管疾患を含んでいた。
DRGTN0701	P1NCY	ライブラリは、急性肺水腫、急性気管支肺炎、両側性胸膜滲出、心包液貯留、及び悪性リンパ腫(サチユルキラー細胞タイプ)のため死亡した32才の白人男性の胸部骨髄から取り除かれた後頭神経節組織から増殖された RNA を使って作製された。患者の病歴には、推定サイトメガロウイルス、感染症、肝性鬱血および脂肪変性、脾腫大、出血性膀胱炎、甲状腺出血および顔面麻痺がある。手術には、経膈鏡検査、大腸生検、アテノイド腫瘍摘出術、および上咽頭内視鏡検査および生検が含まれ、治療は放射線療法が含まれている。

10

20

30

40

【表 16】

【 表 1 7 】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して、不定の塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARAGEL FDF	Fast Data Finderは、アミノ酸または核酸配列の比較、注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI オートアセンブラ	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool はアミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用であり、BLAST はblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列確率値=1.0E-10以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群配との類似性を検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最小5つの機能(fasta、tfasta、fastx、fastyおよびsssearch)がある。	Pearson, W.Rand D.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E 値=1.06E-6 構築されたESTs: 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. および J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. およびS. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:38-105; およびAltwood, T.K. 他 (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3以下
HMMER	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マルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a NuShell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM ヒット: 確率値 = 1.0E-3 以下 シングルペプチドヒット:スコア=0以上

10

20

30

40

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連値
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. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質のスコアとその特定のPrositeモチーフに対するGCG指定" HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1.
Phred	高い感度と精度で自動配列決定機のプロセスを調べ、エラーを修正しアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプライメンテーションに基づくSWATやCrossMatchを含むPhils Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=36以上
Consed	Phrapで構築したものの表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリックス解析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Clavette, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	加重マトリックスを用いて蛋白配列での膜貫通セグメントの描写および配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM)を使って蛋白配列の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (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で定義された配列と一致したパターンをアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, 第9版, M51-59頁, 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
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/90148 A2(51) International Patent Classification: **C07K 14/00**

(21) International Application Number: PCT/US01/16283

(22) International Filing Date: 17 May 2001 (17.05.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/205,518 19 May 2000 (19.05.2000) US
60/213,956 22 June 2000 (22.06.2000) US
60/215,105 28 June 2000 (28.06.2000) US
60/218,947 14 July 2000 (14.07.2000) US
60/228,448 27 July 2000 (27.07.2000) 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): **SANJANWALA, Madhu, S.** [US/US]; 210 Sylvania Court, Los Altos, CA 94024 (US). **WALIA, Narinder, K.** [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). **TRIBOULEY, Catherine, M.** [FR/US]; 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US). **YUE, Henry** [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US). **GANDHI, Ameena, R.** [US/US]; 837 Roble Avenue #1, Menlo Park, CA 94025 (US). **DING, Li** [CN/US]; 3353 Alma Street #146, Palo Alto, CA 94306 (US). **YAO, Monique, G.** [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US). **LAL, Preeti** [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara,CA 95056 (US). **BAUGHN, Mariah, R.** [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). **HAFALIA, April** [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA 95054 (US). **ELLIOTT, Vicki, S.** [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US). **PATTERSON, Chandra** [US/US]; 490 Sherwood Way #1, Menlo Park, CA 94025 (US). **RANKUMAR, Jay** [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA 94535 (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, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

WO 01/90148 A2

(54) Title: NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention provides human neurotransmitter transporter (NTT) and polynucleotides which identify and encode NTT. 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 NTT.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of neurotransmitter transporters and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of transport, neurological and psychiatric disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of neurotransmitter transporters.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The human nervous system, which regulates all bodily functions, is composed of the central nervous system (CNS), consisting of the brain and spinal cord, and the peripheral nervous system (PNS), consisting of afferent neural pathways for conducting nerve impulses from sensory organs to the CNS, and efferent neural pathways for conducting motor impulses from the CNS to effector organs. The PNS can be further divided into the somatic nervous system, which regulates voluntary motor activity such as for skeletal muscle, and the autonomic nervous system, which regulates involuntary motor activity for internal organs such as the heart, lungs, and viscera.

The central nervous system (CNS) is composed of more than 100 billion neurons at the spinal cord level, the lower brain level, and the higher brain or cortical level. Neurons transmit electric or chemical signals between cells. The spinal cord, a thin, tubular extension of the central nervous system within the bony spinal canal, contains ascending sensory and descending motor pathways, and is covered by membranes continuous with those of the brainstem and cerebral hemispheres. The spinal cord contains almost the entire motor output and sensory input systems of the trunk and limbs, and neuronal circuits in the cord also control rhythmic movements, such as walking, and a variety of reflexes. The lower areas of the brain such as the medulla, pons, mesencephalon, cerebellum, basal ganglia, substantia nigra, hypothalamus, and thalamus control unconscious activities including arterial pressure and respiration, equilibrium, and feeding reflexes, such as salivation. Emotions, such as anger, excitement, sexual response, and reaction to pain or pleasure, originate in the lower brain. The cerebral cortex or higher brain is the largest structure, consisting of a right and a left hemisphere interconnected by the corpus callosum. The cerebral cortex is involved in sensory, motor, and integrative functions related to perception, voluntary musculoskeletal movements, and the broad range of activities associated with consciousness, language, emotions, and memory. The cerebrum functions in association with the lower centers of the nervous system.

A nerve cell (neuron) contains four regions, the cell body, axon, dendrites, and axon terminal. The cell body contains the nucleus and other organelles. The dendrites are processes which extend

WO 01/90148

PCT/US01/16283

outward from the cell body and receive signals from sense organs or from the axons of other neurons. These signals are converted to electrical impulses and transmitted to the cell body. The axon, whose size can range from one millimeter to more than one meter, is a single process that conducts the nerve impulse away from the cell body. Cytoskeletal fibers, including microtubules and neurofilaments, run

5 the length of the axon and function in transporting proteins, membrane vesicles, and other macromolecules from the cell body along the axon to the axon terminal. Some axons are surrounded by a myelin sheath made up of membranes from either an oligodendrocyte cell (CNS) or a Schwann cell (PNS). Myelinated axons conduct electrical impulses faster than unmyelinated ones of the same diameter. The axon terminal is at the tip of the axon away from the cell body. (See Lodish, H. et al. 10 (1986) Molecular Cell Biology Scientific American Books New York NY, pp. 715-719.)

CNS-associated proteins have roles in neuronal signaling, cell adhesion, nerve regeneration, axon guidance, neurogenesis, and other functions. Certain CNS-associated proteins form an integral part of a membrane or are attached to a membrane. For example, neural membrane protein 35 (NMP35) is closely associated with neuronal membranes and is known to be highly expressed in the rat

15 adult nervous system. (Schweitzer, B. et al. (1998) *Mol. Cell. Neurosci.* 11:260-273.) Synaptophysin (SY) is a major integral membrane protein of small synaptic vesicles. The chromosomal location of SY in human and mouse is on the X chromosome in subbands Xp11.22-p11.23. This region has been implicated in several inherited diseases including Wiskott-Aldrich syndrome, three forms of X-linked hypercalciuric nephrolithiasis, and the eye disorders retinitis pigmentosa 2, congenital stationary night

20 blindness, and Aland Island eye disease. (Fisher, S. E. et al. (1997) *Genomics* 45:340-347.) Peripherin or retinal degeneration slow protein (rds) is an integral membrane glycoprotein that is present in the rims of photoreceptor outer segment disks. In mammals, rds is thought to stabilize the disk rim through heterophilic interactions with related nonglycosylated proteins. Rds is a mouse neurological mutation that is characterized by abnormal development of rod and cone photoreceptors followed by their slow

25 degeneration. (Kedzierski, W.J. et al. (1999) *Neurochem.* 72:430-438.)

43 KD postsynaptic protein or acetylcholine receptor-associated 43 KD protein (RAPSYN) is thought to play a role in anchoring or stabilizing the nicotinic acetylcholine receptor at synaptic sites. RAPSYN is involved in membrane association and may link the nicotinic acetylcholine receptor to the underlying postsynaptic cytoskeleton. (Buckel, A. et al. (1996) *Genomics* 35:613-616.)

30 Neuritin is a protein whose gene is known to be induced by neural activity and by neurotrophins which promotes neuritogenesis. Neuraxin is a structural protein of the rat central nervous system that is believed to be immunologically related to microtubule-associated protein 5 (MAP5). Neuraxin is a novel type of neuron-specific protein which is characterized by an unusual amino acid composition, 12 central heptadecarepeats and putative protein and membrane interaction sites. The gene encoding neuraxin is

WO 01/90148

PCT/US01/16283

unique in the haploid rat genome and is conserved in higher vertebrates. Neuraxin is implicated in neuronal membrane-microtubule interactions and is expressed throughout the rodent central nervous system (CNS). (Rienitz, A. et al. (1989) EMBO J. 8:2879-2888.)

5 NudC, a nuclear movement protein, interacts with the lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration. People with Miller-Dieker syndrome (MDS) or isolated lissencephaly sequence (ILS) have a hemizygous deletion or mutation in the LIS1 gene. Both conditions are characterized by a smooth cerebral surface, a thickened cortex with four abnormal layers, and misplaced neurons. LIS1 is highly expressed in the ventricular zone and the cortical plate. The interaction of Lis1 with NudC, in conjunction with the MDS and ILS phenotypes, raises the possibility
10 that nuclear movement in the ventricular zone is closely related to neuronal fates and to cortical architecture. (Morris, S. M. et al. (1998) Curr. Biol. 8:603-606.)

CNS-associated proteins can also be phosphoproteins. For example, ARPP-21 (cyclic AMP-regulated phosphoprotein) is a cytosolic neuronal phosphoprotein that is highly enriched in the striatum and in other dopaminergic regions of the brain. The steady-state level of ARPP-21 mRNA
15 is developmentally regulated. But, in the neonatal and mature animal, ARPP-21 mRNA is not altered following 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra or by pharmacologic treatments that upregulate the D1- or D2-dopamine receptors. (Ehrlich, M. E. et al. (1991) Neurochem. 57:1985-1991.)

CNS-associated signaling proteins may contain PDZ domains. PDZ domains have been found
20 in proteins which act as adaptors in the assembly of multifunctional protein complexes involved in signaling events at surfaces of cell membranes. PDZ domains are generally found in membrane-associated proteins including neuronal nitric oxide synthase (NOS) and several dystrophin-associated proteins. (Ponting, C. P. et al. (1997) Bioessays 19:469-479.)

CNS-associated proteins may also contain epidermal growth factor (EGF) domains. The Notch
25 proteins are transmembrane proteins which contain extracellular regions of repeated EGF domains. Notch proteins, such as the *Drosophila melanogaster* neurogenic protein Notch, are generally involved in the inhibition of developmental processes. Other members of the Notch family are the *lin-12* and *glp-1* genes of *Caenorhabditis elegans*. Genetic studies indicate that the *lin-12* and *glp-1* proteins act as receptors in specific developmental cell interactions which may be involved in certain embryonic defects. (Tax, F. E. et al. (1994) Nature 368:150-154.) Pecanex, a maternal-effect neurogenic locus
30 of *D. melanogaster* is believed to encode a large transmembrane protein. In the absence of maternal expression of the pecanex gene, an embryo develops severe hyperneuralization similar to that characteristic of Notch mutant embryos. (LaBonne, S. G. et al. (1989) Dev. Biol. 136:1-116.) Other CNS-associated signaling proteins contain WW domains. The WW domain is a protein motif with two

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- highly conserved tryptophans. It is present in a number of signaling and regulatory proteins, including Huntingtin interacting protein. Several fibroblast growth factor (FGF) homologous factors (*i.e.*, FHF polypeptides) have also been implicated in nervous system development based on mRNA expression patterns in mouse and human tissues. Members of the FHF family of polypeptides are structurally
- 5 distinct from prototypic FGFs, consistent with the unusual role of these FGF-related proteins (Smallwood, P.M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:9850-9857 and Hartung, H. et al. (1997) Mech. Dev. 64:31-39).
- Alzheimer's disease (AD) is a degenerative disorder of the CNS which causes progressive memory loss and cognitive decline during mid to late adult life. AD is characterized by a wide range of
- 10 neuropathologic features including amyloid deposits and intra-neuronal neurofibrillary tangles. Although the pathogenic pathway leading to neurodegeneration and AD is not well understood, at least three genetic loci that confer genetic susceptibility to the disease have been identified. (Schellenberg, G.D. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92:8552-8559; Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375:754-760.)
- Neuronal Thread Proteins (NTP) are a group of immunologically related molecules found in
- 15 the brain and neuroectodermal tumor cell lines. NTP expression is increased in neuronal cells during proliferation, differentiation, brain development, in Alzheimer's disease (AD) brains, and in pathological states associated with regenerative nerve sprouting (de la Monte, S.M. et al. (1996) J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55:1038-1050). Monoclonal antibodies generated to a recombinant NTP, AD7c-NTP, isolated from an end-stage AD brain library, showed high levels of NTP
- 20 immunoreactivity in perikarya, neuropil fibers, and white matter fibers of AD brain tissue. *In vitro* studies also demonstrated NTP upregulation, phosphorylation, and translocation from the perikarya to cell processes and growth cones during growth factor-induced neuritic sprouting and neuronal differentiation. Additionally, increased NTP immunoreactivity was found in Down syndrome brains beginning in the second decade, prior to establishment of widespread AD neurodegeneration, and at
- 25 an age when a low-level or an absence of NTP expression was observed in control brains. These findings indicated that abnormal expression and accumulation of NTP in brain may be an early marker of AD neurodegeneration in Down syndrome (de la Monte, S.M. et al. (1996) J. Neurol. Sci. 135:118-125). Furthermore, the increased expression and accumulation of NTP in AD brain tissue was paralleled by corresponding elevations of NTP in cerebrospinal fluid (CSF), and elevated levels
- 30 of NTP were detectable in the CSF early in the course of the disease.
- Astrocytomas, and the more malignant glioblastomas, are the most common primary tumors of the brain, accounting for over 65% of primary brain tumors. These tumors arise in glial cells of the astrocyte lineage. Following infection by pathogens, astrocytes function as antigen-presenting cells and modulate the activity of lymphocytes and macrophages. Astrocytomas constitutively express many

WO 01/90148

PCT/US01/16283

cytokines and interleukins that are normally produced only after infection by a pathogen (de Micco, C. (1989) *J. Neuroimmunol.* 25:93-108). In the course of identifying genes related to astrocyte differentiation, one cDNA was isolated from an astrocytoma cDNA library that encodes a protein structurally related to the plant pathogenesis-related (PR) proteins (Murphy, E.V. et al. (1995) *Gene* 5 159:131-135). The glioma pathogenesis-related protein (GliPR) is highly expressed in glioblastoma, but not in fetal or adult brain, or in other nervous system tumors. PR proteins are a family of small (10-20 kDa), protease resistant proteins induced in plants by viral infections, such as tobacco mosaic virus. The synthesis of PR proteins is believed to be part of a primitive immunological response in plants (van Loon, L.C. (1985) *Plant Mol. Biol.* 4:111-116). GliPR shares up to 50% homology with the PR-1 protein family over a region that comprises almost two thirds of the protein, including a conserved triad of amino acids, His-Glu-His, appropriately spaced to form a metal-binding domain (Murphy et al., *supra*).

Fe65-like protein (Fe65L2), a new member of the Fe65 protein family, is one of the ligands that interacts with the cytoplasmic domain of Alzheimer beta-amyloid precursor protein (APP). Transgenic mice expressing APP are known to simulate some of the prominent behavioral and pathological features of Alzheimer's disease, including age-related impairment in learning and memory, neuronal loss, gliosis, neuritic changes, amyloid deposition, and abnormal tau phosphorylation. Proteins that interact with the cytoplasmic domain of APP provide new insights into the physiological function of APP and, in turn, into the pathogenesis of Alzheimer's disease. (Dutilleul, A. et al. (1998) *Biochem. J.* 330:513-519.)

Contact from one neuron to another occurs at a specialized site called the synapse. At this site, the axon terminal from one neuron (the presynaptic cell) sends a signal to another neuron (the postsynaptic cell). Synapses may be connected either electrically or chemically. An electrical synapse consists of gap junctions connecting the two neurons, allowing electrical impulses to pass directly from the presynaptic to the postsynaptic cell. In a chemical synapse, the axon terminal of the presynaptic cell contains membrane vesicles containing a particular neurotransmitter molecule. A change in electrical potential at the nerve terminal results in the influx of calcium ions through voltage-gated channels which triggers the release of the neurotransmitter from the synaptic vesicle by exocytosis. The neurotransmitter rapidly diffuses across the synaptic cleft separating the presynaptic nerve cell from the postsynaptic cell. The neurotransmitter then binds receptors and opens transmitter-gated ion channels located in the plasma membrane of the postsynaptic cell, provoking a change in the cell's electrical potential. This change in membrane potential of the postsynaptic cell may serve either to excite or inhibit further transmission of the nerve impulse. Presynaptic calcium channel activity is modulated by cysteine-string proteins (CSPs). CSPs are secretory vesicle proteins that function in neurotransmission as well as in exocytosis in other cell-types. The effect of CSPs on calcium levels is

WO 01/90148

PCT/US01/16283

likely to be downstream of calcium release and is likely to involve exocytosis, possibly in connection with G-proteins (Magga, J.M. et al. (2000) *Neuron* 28:195-204; and Dawson-Scully, K. et al. (2000) *J. Neurosci.* 20:6039-6047; and Chamberlain, L.H. et al. (2001) *J. Cell Sci.* 114:445-455).

Neurotransmitters comprise a diverse group of some 30 small molecules which include

- 5 acetylcholine, monoamines such as serotonin, dopamine, and histamine, and amino acids such as gamma-aminobutyric acid (GABA), glutamate, and aspartate, and neuropeptides such as endorphins and enkephalins. (McCance, K.L. and Huether, S.E. (1994) PATHOPHYSIOLOGY, The Biologic Basis for Disease in Adults and Children, 2nd edition, Mosby, St. Louis, MO, pp 403-404.) Many of these molecules have more than one function and the effects may be excitatory, e.g. to depolarize the
- 10 postsynaptic cell plasma membrane and stimulate nerve impulse transmission, or inhibitory, e.g. to hyperpolarize the plasma membrane and inhibit nerve impulse transmission.

Neurotransmitters and their receptors are targets of pharmacological agents aimed at controlling neurological function. For example GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the CNS, and GABA receptors are the principal target of sedatives such as benzodiazepines and

- 15 barbiturates which act by enhancing GABA-mediated effects (Katzung, B.G. (1995) Basic and Clinical Pharmacology, 6th edition, Appleton & Lange, Norwalk, CT, pp. 338-339).

Two major classes of neurotransmitter transporters are essential to the function of the nervous system. The first class is uptake carriers in the plasma membrane of neurons and glial cells, which pump neurotransmitters from the extracellular space into the cell. This process relies on the Na⁺ gradient across the plasma membrane, particularly the co-transport of Na⁺. Two families of proteins have been identified. One family includes the transporters for GABA, monoamines such as noradrenaline, dopamine, serotonin, and amino acids such as glycine, and proline. Common structural components include twelve putative transmembrane α -helical domains, cytoplasmic N- and C- termini, and a large glycosylated extracellular loop separating transmembrane domains three and

25 four. This family of homologous proteins derives their energy from the co-transport of Na⁺ and Cl⁻ ions with the neurotransmitter into the cell (Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters). The second family includes transporters for excitatory amino acids such as glutamate. Common structural components include putative 6-10 transmembrane domains, cytoplasmic N- and C- termini, and glycosylations in the extracellular loops. The excitatory amino acid transporters are not dependent on Cl⁻, and may

30 require intracellular K⁺ ions (Na⁺/K⁺- neurotransmitter transporters) (Liu, Y. et al. (1999) *Trends Cell Biol.* 9:356-363).

The second class of neurotransmitter transporters is present in the vesicle membrane, and concentrates neurotransmitters from the cytoplasm into the vesicle, before exocytosis of the vesicular contents during synaptic transmission. Vesicular transport uses the electrochemical gradient across

WO 01/90148

PCT/US01/16283

the vesicular membrane generated by a H^+ -ATPase. Two families of proteins are involved in the transport of neurotransmitters into vesicles. One family uses primarily proton exchange to drive transport into secretory vesicles and includes the transporters for monoamines and acetylcholine. For example, the monoamine transporters exchange two luminal protons for each molecule of cytoplasmic transmitter. The second family includes the GABA transporters, which relies on the positive charge inside synaptic vesicles. The two classes of vesicular transporters show no sequence similarity to each other and have structures distinct from those of the plasma membrane carriers (Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595-599; Liu, Y. et al. (1999) *Trends Cell Biol.* 9:356-363).

GABA is the predominant inhibitory neurotransmitter and is widely distributed in the mammalian nervous system. GABA is cleared from the synaptic cleft by specific, high-affinity, Na^+ - and Cl^- - dependent transporters, which are thought to be localized to both pre- and postsynaptic neurons, as well as to surrounding glial cells. At least four GABA transporters (GAT1-GAT4) have been cloned (Liu, Q.-R. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2106-2112). Studies of [3H]-GABA uptake into cultured cells and plasma-membrane vesicles isolated from various tissues revealed considerable differences in GABA transporter heterogeneity. GABA transporters exhibit differences in substrate affinity and specificity, distinct blocker pharmacologies, and different tissue localization. For example, the K_m values of GABA uptake of the expressed GAT1 to GAT4 are 6, 79, 18, and 0.8 μM , respectively. In addition to transporting GABA, GAT2 also transports betaine; GAT3 and GAT4 also transport β -alanine and taurine. Pharmacological studies revealed that GABA transport by GAT1 and GAT4 is more sensitive to 2,4-diaminobutyric acid and guavacine than that by GAT2 and GAT3. *In situ* hybridization showed that GAT1 and GAT4 expression is brain specific. GAT2 and GAT3 mRNAs were detected in tissues such as liver and kidney (Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595-599; Borden, L.A. (1996) *Neurochem. Int.* 29:335-356; Nelson, N. (1998) *J. Neurochem.* 71:1785-1803).

Human studies indicated that GABA transporter function is reduced in epileptic hippocampi. Decreased GABAergic neurotransmission has also been implicated in the pathophysiology of schizophrenia (Simpson, M.D. et al. (1992) *Psychiatry Res.* 42:273-282).

Diazepam binding inhibitor (DBI), also known as endozeptin and acyl-Coenzyme (CoA)-binding protein, is an endogenous GABA receptor ligand which is thought to down-regulate the effects of GABA. DBI binds medium- and long-chain acyl-CoA esters with very high affinity and may function as an intracellular carrier of acyl-CoA esters (*125950 Diazepam Binding Inhibitor; DBI, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM); PROSITE PDOC00686 Acyl-CoA-binding protein signature).

Glycine serves as one of the major inhibitory neurotransmitters in the mammalian nervous

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- system by activating chloride-channel receptors, which are members of a ligand-gated ion-channel superfamily (Betz, H. (1990) *Neuron* 5:383-392). Glycine also facilitates excitatory transmission through an allosteric activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Johnson, J.W. and P. Ascher (1987) *Nature* 325:529-531). Two forms of glycine transporters have been described to date, GLYT 1 and GLYT 2. The two variants of GLYT1 (GLYT1 a/b) are generated by alternative splicing (Liu, Q.-R. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:22802-22808) and differ in their amino-terminal sequences. The proteins have similar affinity for glycine and both are sensitive to N-methyl-aminoacetic acid. *In situ* hybridization revealed that GLYT1a transcripts were detected in a both neural and non-neural tissues, whereas GLYT1b was detected only in neural tissues (Borowsky, B. et al. (1993) *Neuron* 10:851-863). High levels of GLYT1a/b mRNA were found in hippocampus and cortex, suggesting a co-localization of this transporter with NMDA receptors and implying its involvement in the regulation of excitatory synaptic transmission. It is not clear whether GLYT1a is expressed in neurons, in glia or in both. In contrast, GLYT1b is found almost exclusively in fiber tracts, suggesting its localization in glial cells (Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595-599).
- The second identified glycine transporter (GLYT2) differs from GLYT1a/b by its extended intracellular amino terminus. The predominant localization of its mRNA in brainstem and spinal cord and its insensitivity to N-methyl-aminoacetic acid suggests that GLYT2 terminates signal transduction at the strychnine-sensitive inhibitory glycine receptor. It has been proposed that, upon depolarization of cells harboring GLYT1b, the transporter runs backwards and releases glycine to act as a neuromodulatory amino acid at the NMDA receptor (Attwell, D. and M. Bouvier (1992) *Curr. Biol.* 2:541-543). Such a Ca^{2+} -independent, non-vesicular release of neurotransmitters by reverse transport was demonstrated for glutamate and serotonin. This evidence suggests that the transmitter transporters may be important for both the initiation and termination of neurotransmitter action (Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595-599).
- The plasma membrane dopamine transporter (DAT) is essential for the reuptake of released dopamine from the synapse. Uptake of dopamine is temperature- and time-dependent, and is inhibited by a variety of compounds, such as cocaine. DAT- knockout mice have been shown to exhibit extreme hyperactivity and resistance to both cocaine and amphetamine, consistent with the primary action of cocaine on DAT (Giros, B. et al. (1996) *Nature* 379:606-612). The perturbation of the tightly regulated DAT also predisposes neurons to damage by a variety of insults. Most notable is the selective degeneration of DAT-expressing dopamine nerve terminals in the striatum thought to underlie Parkinson's disease. DAT expression can predict the selective vulnerability of neuronal populations, which suggests that therapeutic strategies aimed at altering DAT function could have significant benefits in a variety of disorders (Gary, W.M. et al. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.*

WO 01/90148

PCT/US01/16283

20:424-429).

Creatine transporters are strongly related to transporters for GABA. The primary sequence identity between creatine transporter species homologs is very high (98-99%). Pharmacological characterization demonstrated high affinity creatine uptake (27-43 μ M), which was blocked by creatine analogs with high affinity. Creatine transporters are widely expressed in a variety of mammalian tissues, including brain, adrenal gland, intestine, colon, prostate, thymus, ovary, spleen, pancreas, placenta, umbilical cord, thyroid, tongue, pharynx, vertebral discs, jaw, and nasal epithelium. Genetic mapping in the mouse localizes the creatine transporter to a region on the X chromosome in linkage conservation with the human region Xq28, the location of the genes for several neuromuscular diseases (Nash, S.R. et al. (1994) *Receptors Channels* 2:165-174).

The substrates of a number of cDNA clones encoding proteins of the Na^+/Cl^- -dependent transporter families are still not identified. These are orphan transporters. Identification of the substrates for orphan transporters has been difficult because *in situ* hybridization and immunohistochemistry indicate that the transporters are synthesized by phenotypically different neuronal populations, for example glutaminergic, GABAergic, histaminergic, or serotonergic neurons. One of the transporters, NTT4 exhibits the highest homology to the creatine transporter. It differs structurally from other members of this family in having an unusually long loop between transmembranes seven and eight (Liu, Q.-R. et al. (1993) *FEBS Lett.* 315:114-118; Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:595-599).

Glutamate is a major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. Electrogenic (Na^+ / K^+)-coupled glutamate transporters, located in the plasma membranes of nerve terminals and glial cells, mediate removal of glutamate released at excitatory synapses and maintain extracellular concentrations below neurotoxic levels. Glutamate transporters achieve this process by co-transport with three sodium ions and one proton, followed by translocation of a potassium ion in the opposite direction (Zerangue, N. and M.P. Kavanaugh (1996) *Nature* 383:634-637).

Glutamate transporters belong to a large family of transport proteins. The membrane topology of the glutamate transporter reveals six membrane-spanning helices in the N-terminal part of the proteins (Slotboom, D.J. et al. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:293-307). The C-terminal half of the glutamate transporter is well conserved and constitutes a major part of the translocation pathway and contains the binding sites for the substrate and co-transported ions (Zhang, Y. and B.I. Kanner (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1710-1715).

Impaired re-uptake of synaptic glutamate, and a reduced expression of glutamate transporters have been found in the motor cortex of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Inhibition of the synthesis of each glutamate transporter subtype using chronic antisense oligonucleotide administration, *in vitro* and *in vivo*, selectively and specifically reduced the protein expression and

WO 01/90148

PCT/US01/16283

function of glutamate transporters. The loss of glial glutamate transporters produced elevated extracellular glutamate levels, neurodegeneration characteristic of excitotoxicity, and a progressive paralysis. The loss of the neuronal glutamate transporter did not elevate extracellular glutamate in the striatum but produced mild neurotoxicity and resulted in epilepsy (Rothstein, J.D. et al. (1996)

5 Neuron 16:675-686).

The vesicular monoamine transporters (VMAT) package cytoplasmic monoamine neurotransmitters into secretory vesicles for regulated exocytotic release. VMAT acts as an electrogenic exchanger of protons and monoamines, using a proton electrochemical gradient. Two VMAT transporters, VMAT1 and VMAT2 have been cloned from rat, bovine and human. The

10 VMAT proteins possess twelve transmembrane segments, with both extremities lying on the cytoplasmic side. Examination of the subcellular localization of VMAT proteins indicates that they are associated with distinct vesicle populations in neurons and neuroendocrine cells. In rat, VMAT1 is expressed in the adrenal gland whereas VMAT2 is expressed in the brain. In contrast, the bovine adrenal gland expresses both VMAT1 and VMAT2 (Henry, J.-P. et al. (1994) J. Exp. Biol.

15 196:251-262.).

Vesicular transport is inhibited by the antihypertensive drug reserpine and the related but more centrally acting drug tetrabenazine. The mechanism of transport and the biochemistry of VMAT have been analyzed with these drugs, using mainly the chromaffin granules from bovine adrenal glands as a source of transporters (Peter, D. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:7231-7237).

20 Human studies indicated that reserpine can cause a syndrome resembling depression, indicating the importance of vesicular transport activity for the control of mood and behavior. The psychostimulant amphetamine also disrupts the storage of amines in secretory vesicles, further indicating that alterations in vesicular monoamine transport can affect behavior (Sulzer, D. and S. Rayport (1990) Neuron 5:797-808).

25 Human diseases caused by defects in neurotransmitter transporters include schizophrenia, Tourette's syndrome, Parkinson's disease, brain ischemia, amyotrophic lateral sclerosis, depression, and epilepsy. For example, decreased GABAergic neurotransmission has been implicated in the pathophysiology of CNS disorders such as epilepsy and schizophrenia. Impaired re-uptake of synaptic glutamate, and a reduced expression of the glutamate transporter have been found in the

30 motor cortex of patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The loss of glial glutamate transporters produces elevated extracellular glutamate levels, neurodegeneration characteristic of excitotoxicity, and a progressive paralysis. The loss of neuronal glutamate transporters produces mild neurotoxicity and result in epilepsy (Rothstein, J.D. et al. (1996) Neuron 16:675-686).

Transporters for dopamine, norepinephrine, and serotonin have particular significance as

35 targets for clinically relevant psychoactive agents including cocaine, antidepressants, and

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- amphetamines. Cocaine and antidepressants are transporter antagonists that act with varying degrees of specificity to enhance synaptic concentrations of amines by limiting clearance. Amphetamines enhance transporter mediated efflux in concert with a depletion of vesicular amine stores (Barker, E.L. and R.D. Blakely (1995) *Psychopharmacology* 28:321-333; Sulzer, D. and S. Rayport (1990) *Neuron* 5:797-808; Wall, S.C. et al. (1995) *Mol. Pharmacol.* 47:544-550).
- Each of over a trillion neurons in adult humans connects with over a thousand target cells (Tessier-Lavigne, M. et al. (1996) *Science* 274:1123-1133). These neuronal connections form during embryonic development. Each differentiating neuron sends out an axon tipped at the leading edge by a growth cone. Aided by molecular guidance cues, the growth cone migrates through the embryonic environment to its synaptic target. Semaphorins are growth cone guidance signals that may function during embryogenesis by providing local signals to specify territories inaccessible to growing axons (Puschel, A.W. et al. (1995) *Neuron* 14:941-948).
- The guidance of axons during development involves both positive and negative effects (*i.e.*, chemotraction and chemorepulsion). The Slit family of proteins have been implicated in promoting axon branching, elongation, and repulsion. Members of the Slit family have been identified in a variety of organisms, including insects, amphibians, birds, rodents and humans (Guthrie, S. (1999) *Current Biology* 9:R432-R435). Slit proteins appear to be ligands for the repulsive guidance receptor, Roundabout (Robo); however, Slit also cause elongation in some assays. A post-translationally processed form of Slit appears to be the active form of the protein (Guthrie, S. *supra* and Brose, K. et al. (1999) *Cell* 96:795-806).
- Axon growth is also guided in part by contact-mediated mechanisms involving cell surface and extracellular matrix (ECM) molecules. Many ECM molecules, including fibronectin, vitronectin, members of the laminin, tenascin, collagen, and thrombospondin families, and a variety of proteoglycans, can act either as promoters or inhibitors of neurite outgrowth and extension (Tessier-Lavigne et al., *supra*). Receptors for ECM molecules include integrins, immunoglobulin superfamily members, and proteoglycans. ECM molecules and their receptors have also been implicated in the adhesion, maintenance, and differentiation of neurons (Reichardt, L.F. et al. (1991) *Ann. Rev. Neurosci.* 14:531-571). The proteoglycan testican is localized to the post-synaptic area of pyramidal cells of the hippocampus and may play roles in receptor activity, neuromodulation, synaptic plasticity, and neurotransmission (Bonnet, F. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:4373-4380).
- Other nervous system-associated proteins have roles in neuron signaling, cell adhesion, nerve regeneration, axon guidance, and neurogenesis. The neurexophilins are neuropeptide-like proteins which are proteolytically processed after synthesis. They are ligands for the neuron-specific cell surface proteins, the α -neurexins. Neurexophilins and neurexins may participate in a neuron signaling

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- pathway (Missler, M. and T.C. Sudhof (1998) *J. Neurosci.* 18:3630-3638; Missler, M. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:34716-34723). Ninjurin is a neuron cell surface protein which plays a role in cell adhesion and in nerve regeneration following injury. Ninjurin is up-regulated after nerve injury in dorsal root ganglion neurons and in Schwann cells (*602062 Ninjurin; NINJ1 OMIM; Araki, T. and Milbrandt, J. (1996) *Neuron* 17:353-361). Mammalian Numb is a phosphotyrosine-binding (PTB) domain-containing protein which may be involved in cortical neurogenesis and cell fate decisions in the mammalian nervous system. Numb's binding partner, the LNX protein, contains four PDZ domains and a ring finger domain and may participate in a signaling pathway involving Numb. PDZ domains have been found in proteins which act as adaptors in the assembly of multifunctional protein complexes involved in signaling events at surfaces of cell membranes (Ponting, C.P. (1997) *Bioessays* 19:469-479). LNX contains a tyrosine phosphorylation site which may be important for the binding of other PTB-containing proteins such as SHC, an adaptor protein which associates with tyrosine-phosphorylated growth factor receptors and downstream effectors (Dho, S.E. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:9179-9187).
- Another family of molecules that appear to be important for neurotransmission is the choline-transporter-like CTL1 proteins. The prototypic CTL1 was identified in yeast as a suppressor of a choline transport mutation; however, mammalian homologues have been identified. The proteins comprise approximately ten putative transmembrane domains in addition to transporter-like motifs but do not appear to be canonical choline transporters. Choline transport is important to neurotransmission because choline is a precursor of acetylcholine, required in abundance by cholinergic neurons (O'Regan, S. et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:1835-40).
- The discovery of new neurotransmitter transporters 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 transport, neurological and psychiatric disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of neurotransmitter transporters.

SUMMARY OF THE INVENTION

- The invention features purified polypeptides, neurotransmitter transporters, referred to collectively as "NTT" and individually as "NTT-1," "NTT-2," "NTT-3," "NTT-4," "NTT-5," and "NTT-6,". 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:1-6, 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:1-6, c) a

WO 01/90148

PCT/US01/16283

biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-6.

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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12.

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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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 01/90148

PCT/US01/16283

polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

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:7-12, 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:7-12, 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:7-12, 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:7-12, 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:7-12, 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:7-12, 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 01/90148

PCT/US01/16283

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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional NTT, 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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 NTT, 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. The method comprises a) exposing a sample comprising the

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT, comprising

5 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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

15 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:1-6, 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:1-6, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6. 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:7-12, 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 01/90148

PCT/US01/16283

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:7-12, 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:7-12, 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 the biological
 10 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:7-12, 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:7-12, iii) a polynucleotide
 complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide
 15 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 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 01/90148

PCT/US01/16283

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

"NTT" refers to the amino acid sequences of substantially purified NTT 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 NTT. Agonists may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of NTT either by directly interacting with NTT or by acting on components of the biological pathway in which NTT participates.

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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 a given sequence.

“Altered” nucleic acid sequences encoding NTT include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as NTT or a polypeptide with at least one functional characteristic of NTT. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding NTT, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding NTT. 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 NTT. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues, as long as the biological or immunological activity of NTT 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 having similar hydrophobicity 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 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 NTT. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of NTT either by directly interacting with NTT or by acting on components of the biological pathway in which NTT participates.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT 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 NTT, 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 given amino acid sequence" refer broadly to any composition containing the given polynucleotide or

WO 01/90148

PCT/US01/16283

amino acid sequence. The composition may comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequences encoding NTT or fragments of NTT 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
 5 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
 10 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
 15 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
	Cys	Ala, Ser
25	Gln	Asn, Glu, His
	Glu	Asp, Gln, His
	Gly	Ala
	His	Asn, Arg, Gln, Glu
	Ile	Leu, Val
30	Leu	Ile, Val
	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
	Ser	Cys, Thr
35	Thr	Ser, Val
	Trp	Phe, Tyr
	Tyr	His, Phe, Trp
	Val	Ile, Leu, Thr

40 Conservative amino acid substitutions generally maintain (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a beta sheet or alpha helical conformation,

WO 01/90148

PCT/US01/16283

(b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the site of the substitution, and/or (c) the bulk of the side chain.

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.

5 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 by glycosylation, pegylation, or any similar process that retains at least one biological or immunological
10 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 absent gene or protein expression, determined by comparing at least two different samples. Such
15 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 NTT or the polynucleotide encoding NTT which is identical in sequence to but shorter in length than the parent sequence. A fragment may comprise up to the entire length of the defined sequence, minus one nucleotide/amino acid residue. For example, a
20 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 example, a polypeptide fragment may comprise a certain length of contiguous amino acids selected
25 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.

A fragment of SEQ ID NO:7-12 comprises a region of unique polynucleotide sequence that
30 specifically identifies SEQ ID NO:7-12, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:7-12 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:7-12 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:7-12 and the region of SEQ ID NO:7-12 to which the fragment corresponds are routinely

WO 01/90148

PCT/US01/16283

determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-6 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:7-12. A fragment of SEQ ID NO:1-6 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-6. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-6 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-6. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-6 and the region of SEQ ID NO:1-6 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 polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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/blast/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
 5 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

Penalty for mismatch: -2

10 *Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties*

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

15 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
 20 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
 25 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,
 30 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 program (described and referenced above). For pairwise alignments of polypeptide sequences using

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

- 5 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

- 10 *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 15 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 20 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.

- 25 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. 30 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 annealing of nucleic acid sequences are routinely determinable by one of ordinary skill in the art and

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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
10 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.

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.
15 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 formamide at a concentration of about 35-50% v/v, may also be used under particular circumstances,
20 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.

The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid
25 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).

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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

and systemic defense systems.

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of NTT 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
 5 NTT 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.

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

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
 15 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
 20 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
 25 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 NTT 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
 30 cell type depending on the enzymatic milieu of NTT.

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding NTT, 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 labels include radioactive isotopes, ligands, chemiluminescent agents, and enzymes. "Primers" are

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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).

5 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

10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 primers, microarray elements, or specific probes to identify fully or partially complementary
 5 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. This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the
 10 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. Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to transform a cell.

15 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 regions of a gene and includes enhancers, promoters, introns, and 5' and 3' untranslated regions (UTRs).
 20 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, chemiluminescent, or chromogenic agents; substrates; cofactors; inhibitors; magnetic particles; and
 25 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 instead of deoxyribose.

30 The term "sample" is used in its broadest sense. A sample suspected of containing NTT, nucleic acids encoding NTT, 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.

The terms "specific binding" and "specifically binding" refer to that interaction between a

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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
 5 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
 10 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,
 15 microparticles and capillaries. The substrate can have a variety of surface forms, such as wells, trenches, pins, channels and pores, to which polynucleotides 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
 20 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"
 25 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
 30 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 vitro* fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. The

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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),
 5 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
 15 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
 20 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
 30 certain defined length of one of the polypeptides.

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human neurotransmitter transporters (NTT), the polynucleotides encoding NTT, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or

WO 01/90148

PCT/US01/16283

prevention of transport, neurological and psychiatric disorders.

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 neurotransmitter transporters. For example, SEQ ID NO:4 is 95% identical to human taurine transporter (GenBank ID g799339) 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. SEQ ID NO:4 also contains a sodium:neurotransmitter symporter family (SNF) signature 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, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:4 is an SNF

WO 01/90148

PCT/US01/16283

neurotransmitter transporter. In an alternate example, SEQ ID NO:5 is 94% identical to human dopamine transporter (GenBank ID g181656) 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. SEQ ID NO:5 also contains a

5 sodium neurotransmitter symporter family 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, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:5 is a dopamine transporter. In an alternate example, SEQ ID NO:6 is 90% identical to rat neurotransmitter transporter rB21a (GenBank ID g914028;

10 Smith, K.E. et al. (1995) FEBS Lett. 357:86-92) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 5.7e-300, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:6 also contains sodium:neurotransmitter symporter family domains as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein

15 family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, PROFILESCAN, and BLAST analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:6 is a sodium:neurotransmitter symporter. SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3 were analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-6 are described in Table 7.

As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were

20 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. Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of

25 the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:7-12 or that distinguish between SEQ ID NO:7-12 and related polynucleotide sequences. Column 5 shows identification numbers corresponding to cDNA sequences, coding sequences (exons) predicted from genomic DNA, and/or sequence assemblages comprised of both cDNA and genomic DNA. These sequences were used to assemble the full length polynucleotide

30 sequences of the invention. Columns 6 and 7 of Table 4 show the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and 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 Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. For example,

WO 01/90148

PCT/US01/16283

5407696F6 is the identification number of an Incyte cDNA sequence, and BRAMNOT01 is the cDNA library from which it is derived. Incyte cDNAs for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries (e.g., 70501086V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to GenBank cDNAs or ESTs (e.g., g1748013) 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. 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, FL7472800_g7108462_g181656 is the identification number of a "stretched" sequence, with 7472800 being the Incyte project identification number, g7108462 being the GenBank identification number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching" algorithm was applied, and g181656 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 NTT variants. A preferred NTT 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 NTT amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of NTT.

The invention also encompasses polynucleotides which encode NTT. In a particular embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12, which encodes NTT. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:7-12, 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.

The invention also encompasses a variant of a polynucleotide sequence encoding NTT. In particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least

WO 01/90148

PCT/US01/16283

about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding NTT. A particular aspect of the invention encompasses a variant of a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12 which has at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide
5 sequence identity to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:7-12. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of NTT.

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 NTT, some bearing minimal similarity to the
10 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 accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of naturally occurring NTT, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode NTT and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring NTT under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding NTT or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring
15 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 NTT and its derivatives without altering the encoded amino acid sequences include 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 NTT and NTT 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 using reagents well known in the art. Moreover, synthetic chemistry may be used to introduce mutations into a sequence encoding NTT or any fragment thereof.
20

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:7-12 and fragments thereof under various conditions of stringency. (See, e.g., Wahl, G.M. and S.L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399-407; Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol.*
25

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 embodiments of the invention. The methods may employ such enzymes as the Klenow fragment of
- 5 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 automated with machines such as the MICROLAB 2200 liquid transfer system (Hamilton, Reno NV),
- 10 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 variety of algorithms which are well known in the art. (See, e.g., Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols
- 15 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 NTT may be extended utilizing a partial nucleotide sequence and employing various PCR-based methods known in the art to detect upstream sequences, such as promoters and regulatory elements. For example, one method which may be employed,
- 20 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 known genomic locus and surrounding sequences. (See, e.g., Triglia, T. et al. (1988) Nucleic Acids
- 25 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 sequence before performing PCR. Other methods which may be used to retrieve unknown sequences
- 30 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 commercially available software, such as OLIGO 4.06 primer analysis software (National Biosciences,

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

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.

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.

In another embodiment of the invention, polynucleotide sequences or fragments thereof which encode NTT may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of NTT, 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 NTT.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter NTT-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.

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 improve the biological properties of NTT, such as its biological or enzymatic activity or its ability to

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT 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, NTT 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 NTT, 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 NTT, the nucleotide sequences encoding NTT 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 NTT. Such elements may vary in their strength and specificity. Specific initiation signals may also be used to achieve more efficient translation of sequences encoding NTT. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences, e.g. the Kozak sequence. In cases where

WO 01/90148

PCT/US01/16283

sequences encoding NTT 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

5 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.)

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression

10 vectors containing sequences encoding NTT 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 NTT. 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); plant cell systems transformed with viral expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV, or

20 tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (e.g., Ti 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

25 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 Nicola, M. et al. (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6):350-356; Yu, M. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*

30 *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 upon the use intended for polynucleotide sequences encoding NTT. For example, routine cloning,

WO 01/90148

PCT/US01/16283

subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding NTT 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 NTT into the vector's multiple cloning site disrupts the *lacZ* gene, allowing a colorimetric screening procedure for identification of transformed

5 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 NTT are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of NTT may be used. For example, vectors containing the

10 strong, inducible SP6 or T7 bacteriophage promoter may be used.

Yeast expression systems may be used for production of NTT. 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 vectors direct either the secretion or intracellular retention of expressed proteins and enable integration of foreign sequences into

15 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 NTT. Transcription of sequences encoding NTT 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).

20 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 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.

25 191-196.)

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 NTT may be ligated into an 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

30 infective virus which expresses NTT 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-based vectors may also be used for high-level protein expression.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.)

5 For long term production of recombinant proteins in mammalian systems, stable expression of NTT in cell lines is preferred. For example, sequences encoding NTT 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
10 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,
15 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
20 chlorsulfuron 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
25 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
30 also present, the presence and expression of the gene may need to be confirmed. For example, if the sequence encoding NTT is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences encoding NTT can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding NTT under the control of a single

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT and that express NTT 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 NTT 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 NTT 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 NTT include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding NTT, 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 NTT 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 NTT may be designed to contain signal sequences which direct secretion of NTT through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT 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 NTT protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of NTT 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 NTT encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that NTT 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 NTT 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.

NTT of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to NTT. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for

WO 01/90148

PCT/US01/16283

specific binding to NTT. Examples of test compounds include antibodies, oligonucleotides, proteins (e.g., receptors), or small molecules.

In one embodiment, the compound thus identified is closely related to the natural ligand of NTT, 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 NTT 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 NTT, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli. Cells expressing NTT or cell membrane fractions which contain NTT are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either NTT 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 NTT, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of NTT 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.

NTT of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that modulate the activity of NTT. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for NTT activity, wherein NTT is combined with at least one test compound, and the activity of NTT in the presence of a test compound is compared with the activity of NTT in the absence of the test compound. A change in the activity of NTT in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of NTT. Alternatively, a test compound is combined with an in vitro or cell-free system comprising NTT under conditions suitable for NTT activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of NTT 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 NTT or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES)

WO 01/90148

PCT/US01/16283

cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of 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
 5 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).
 10 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 NTT may also be manipulated *in vitro* in ES cells derived from
 15 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 NTT can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs)
 20 or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region of a polynucleotide encoding NTT 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
 25 inbred to overexpress NTT, e.g., by secreting NTT 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 NTT and neurotransmitter transporters. In addition, the expression of NTT is
 30 closely associated with brain, neurological, secretory, and tumor tissue. Therefore, NTT appears to play a role in transport, neurological and psychiatric disorders. In the treatment of disorders associated with increased NTT expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of NTT. In the treatment of disorders associated with decreased NTT expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of NTT.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Therefore, in one embodiment, NTT 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 NTT. Examples of such disorders include, but are not limited to, a transport disorder such as akinesia, amyotrophic lateral sclerosis, ataxia telangiectasia, cystic fibrosis, Becker's muscular dystrophy, Bell's palsy, Charcot-Marie Tooth disease, diabetes mellitus, diabetes insipidus, diabetic neuropathy, Duchenne muscular dystrophy, hyperkalemic periodic paralysis, normokalemic periodic paralysis, Parkinson's disease, malignant hyperthermia, multidrug resistance, myasthenia gravis, myotonic dystrophy, catatonia, tardive dyskinesia, dystonias, peripheral neuropathy, cerebral neoplasms, prostate cancer; cardiac disorders associated with transport, e.g., angina, bradyarrhythmia, tachyarrhythmia, hypertension, Long QT syndrome, myocarditis, cardiomyopathy, nemaline myopathy, centronuclear myopathy, lipid myopathy, mitochondrial myopathy, thyrotoxic myopathy, ethanol myopathy, dermatomyositis, inclusion body myositis, infectious myositis, polymyositis; neurological disorders associated with transport, e.g., Alzheimer's disease, amnesia, bipolar disorder, dementia, depression, epilepsy, Tourette's disorder, paranoid psychoses, and schizophrenia; and other disorders associated with transport, e.g., neurofibromatosis, postherpetic neuralgia, trigeminal neuropathy, sarcoidosis, sickle cell anemia, Wilson's disease, cataracts, infertility, pulmonary artery stenosis, sensorineural autosomal deafness, hyperglycemia, hypoglycemia, Grave's disease, goiter, Cushing's disease, Addison's disease, glucose-galactose malabsorption syndrome, hypercholesterolemia, adrenoleukodystrophy, Zellweger syndrome, Menkes disease, occipital horn syndrome, von Gierke disease, cystinuria, iminoglycinuria, Hartup disease, and Fanconi disease; 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 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-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal 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, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD),

WO 01/90148

PCT/US01/16283

akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; and a psychiatric disorder such as acute stress disorder, alcohol dependence, amphetamine dependence, anorexia nervosa, antisocial personality disorder,

- 5 attention-deficit hyperactivity disorder, autistic disorder, anxiety, avoidant personality disorder, bipolar disorder, borderline personality disorder, brief psychotic disorder, bulimia nervosa, cannabis dependence, cocaine dependence, conduct disorder, cyclothymic disorder, delirium, delusional disorder, dementia, dependent personality disorder, depression, dysthymic disorder, hallucinogen dependence, histrionic personality disorder, inhalant dependence, manic depression, multi-infarct
10 dementia, narcissistic personality disorder, nicotine dependence, obsessive-compulsive disorder, opioid dependence, oppositional defiant disorder, panic disorder, paranoid personality disorder, phencyclidine dependence, phobia, posttraumatic stress disorder, schizoaffective disorder, schizoid personality disorder, schizophrenia, sedative dependence, separation anxiety disorder, and sleep disorder.

- 15 In another embodiment, a vector capable of expressing NTT 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 NTT including, but not limited to, those described above.

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

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

- 25 In a further embodiment, an antagonist of NTT may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of NTT. Examples of such disorders include, but are not limited to, those transport, neurological and psychiatric disorders described above. In one aspect, an antibody which specifically binds NTT may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to
30 cells or tissues which express NTT.

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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified NTT may be used to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents to identify those which specifically bind NTT. Antibodies to NTT may also be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not 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 NTT 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-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are especially preferable.

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to NTT 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 NTT 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 NTT 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.)

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- 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 NTT-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, G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)
- Antibody fragments which contain specific binding sites for NTT 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 NTT and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering NTT 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 NTT. Affinity is expressed as an association constant, K_a , which is defined as the molar concentration of NTT-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 NTT epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for NTT. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular NTT epitope, represents a true measure of affinity. High-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^9 to 10^{12}

WO 01/90148

PCT/US01/16283

L/mole are preferred for use in immunoassays in which the NTT-antibody complex must withstand rigorous manipulations. Low-affinity antibody preparations with K_d ranging from about 10^6 to 10^7 L/mole are preferred for use in immunopurification and similar procedures which ultimately require dissociation of NTT, preferably in active form, from the antibody (Catty, D. (1988) Antibodies,

- 5 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
 10 specific antibody/ml, is generally employed in procedures requiring precipitation of NTT-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 Coligan et al. supra.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding NTT, or any fragment or
 15 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 NTT. 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 NTT. (See,
 20 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.,
 25 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
 30 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 NTT may be used for somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency

WO 01/90148

PCT/US01/16283

(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 (Blaise, 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), 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 NTT expression or regulation causes disease, the expression of NTT 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 NTT are treated by constructing mammalian expression vectors encoding NTT and introducing these vectors by mechanical means into NTT-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells *in vivo* or *ex vitro* 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 NTT 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). NTT 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 ecodyson-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT 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 respect to NTT expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding NTT 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 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. 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).

In the alternative, an adenovirus-based gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding NTT to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of NTT. 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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* 18:389:239-242, both incorporated by reference herein.

In another alternative, a herpes-based, gene therapy delivery system is used to deliver polynucleotides encoding NTT to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of NTT. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing NTT 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 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 NTT 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 NTT into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of NTT-coding RNAs and the synthesis of high levels of NTT in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT
 5 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
 10 and +10 from the start site, may also be employed to inhibit gene expression. Similarly, inhibition can 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,
 15 *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
 20 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 NTT.

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,
 25 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.

30 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 NTT. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 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.

An additional embodiment of the invention encompasses a method for screening for a compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding NTT. 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 NTT expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding NTT may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased NTT expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding NTT 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 NTT 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 NTT 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 NTT. 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- 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 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 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 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 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 NTT, antibodies to NTT, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of NTT.

- 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, 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 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

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 NTT or fragments thereof. For example, liposome preparations containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of the macromolecule. Alternatively, NTT 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).

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.

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example NTT or fragments thereof, antibodies of NTT, and agonists, antagonists or inhibitors of NTT, 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.

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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

Normal dosage amounts may vary from about 0.1 μg to 100,000 μg , 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, conditions, locations, etc.

10 DIAGNOSTICS

In another embodiment, antibodies which specifically bind NTT may be used for the diagnosis of disorders characterized by expression of NTT, or in assays to monitor patients being treated with NTT or agonists, antagonists, or inhibitors of NTT. Antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as described above for therapeutics. Diagnostic assays for NTT include methods which utilize the antibody and a label to detect NTT 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 NTT, including ELISAs, RIAs, and FACS, are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of NTT expression. Normal or standard values for NTT expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, for example, human subjects, with antibodies to NTT under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantitated by various methods, such as photometric means. Quantities of NTT 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 NTT 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 NTT may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of NTT, and to monitor regulation of NTT levels during therapeutic intervention.

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding NTT or closely related molecules may be used to

WO 01/90148

PCT/US01/16283

identify nucleic acid sequences which encode NTT. 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 NTT, allelic variants, or related sequences.

5 Probes may also be used for the detection of related sequences, and may have at least 50% sequence identity to any of the NTT 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:7-12 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the NTT gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding NTT include the
10 cloning of polynucleotide sequences encoding NTT or NTT derivatives into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may 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
15 coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding NTT may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of NTT. Examples of such disorders include, but are not limited to, a transport disorder such as akinesia, amyotrophic lateral sclerosis, ataxia telangiectasia, cystic fibrosis, Becker's muscular dystrophy, Bell's palsy, Charcot-Marie Tooth disease, diabetes mellitus, diabetes insipidus,
20 diabetic neuropathy, Duchenne muscular dystrophy, hyperkalemic periodic paralysis, normokalemic periodic paralysis, Parkinson's disease, malignant hyperthermia, multidrug resistance, myasthenia gravis, myotonic dystrophy, catatonia, tardive dyskinesia, dystonias, peripheral neuropathy, cerebral neoplasms, prostate cancer; cardiac disorders associated with transport, e.g., angina, bradyarrhythmia, tachyarrhythmia, hypertension, Long QT syndrome, myocarditis, cardiomyopathy, nemaline
25 myopathy, centronuclear myopathy, lipid myopathy, mitochondrial myopathy, thyrotoxic myopathy, ethanol myopathy, dermatomyositis, inclusion body myositis, infectious myositis, polymyositis; neurological disorders associated with transport, e.g., Alzheimer's disease, amnesia, bipolar disorder, dementia, depression, epilepsy, Tourette's disorder, paranoid psychoses, and schizophrenia; and other disorders associated with transport, e.g., neurofibromatosis, postherpetic neuralgia, trigeminal
30 neuropathy, sarcoidosis, sickle cell anemia, Wilson's disease, cataracts, infertility, pulmonary artery stenosis, sensorineural autosomal deafness, hyperglycemia, hypoglycemia, Grave's disease, goiter, Cushing's disease, Addison's disease, glucose-galactose malabsorption syndrome, hypercholesterolemia, adrenoleukodystrophy, Zellweger syndrome, Menkes disease, occipital horn syndrome, von Gierke disease, cystinuria, iminoglycinuria, Hartup disease, and Fanconi disease; a

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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

5 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-

10 Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal 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

15 disorders including mood, anxiety, 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; and a psychiatric disorder such as acute stress disorder, alcohol dependence, amphetamine dependence, anorexia nervosa, antisocial personality disorder,

20 attention-deficit hyperactivity disorder, autistic disorder, anxiety, avoidant personality disorder, bipolar disorder, borderline personality disorder, brief psychotic disorder, bulimia nervosa, cannabis dependence, cocaine dependence, conduct disorder, cyclothymic disorder, delirium, delusional disorder, dementia, dependent personality disorder, depression, dysthymic disorder, hallucinogen dependence, histrionic personality disorder, inhalant dependence, manic depression, multi-infarct

25 dementia, narcissistic personality disorder, nicotine dependence, obsessive-compulsive disorder, opioid dependence, oppositional defiant disorder, panic disorder, paranoid personality disorder, phencyclidine dependence, phobia, posttraumatic stress disorder, schizoaffective disorder, schizoid personality disorder, schizophrenia, sedative dependence, separation anxiety disorder, and sleep disorder. The polynucleotide sequences encoding NTT may be used in Southern or northern analysis,

30 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 NTT expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding NTT may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide

35 sequences encoding NTT may be labeled by standard methods and added to a fluid or tissue sample

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding NTT 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 NTT, 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 NTT, 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. 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 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.

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.

Additional diagnostic uses for oligonucleotides designed from the sequences encoding NTT 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 NTT, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding NTT, and will be employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. Oligomers may also be employed under less stringent conditions for detection or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding NTT 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 NTT 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 amplimers 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).

Methods which may also be used to quantify the expression of NTT 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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, NTT, fragments of NTT, or antibodies specific for NTT may be used as elements on a microarray. The microarray may be used to monitor or measure protein-protein
5 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
10 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
15 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 case of a tissue or biopsy sample, or in vitro, as in the case of a cell line.

20 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
25 (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
30 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

5 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 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 NTT to quantify the levels of NTT expression. In one embodiment, the antibodies are used as elements on a microarray, and

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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; Mendoz, 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. Selthamer (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 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., Brennan, 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 NTT may be used to generate hybridization probes useful in mapping the naturally occurring genomic sequence. Either

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT 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.

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 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 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, NTT, 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 solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The formation of binding complexes between NTT and the agent being tested may be measured.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 synthesized on a solid substrate. The test compounds are reacted with NTT, or fragments thereof, and washed. Bound NTT is then detected by methods well known in the art. Purified NTT 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 antibodies capable of binding NTT specifically compete with a test compound for binding NTT. In this manner, antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with NTT.

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode NTT may be used in any 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, 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. 60/205,518, U.S. Ser. No. 60/213,956, U.S. Ser. No. 60/215,105, U.S. Ser. No. 60/218,947, and U.S. Ser. No. 60/221,488 are expressly incorporated by reference herein.

EXAMPLES

25 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 phenol or 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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).

- 5 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 SUPERScript 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
- 10 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.,
- 15 PBLUESCRIPT 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 including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5 α , DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

20 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

25 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, Y.B. (1994) Anal. Biochem. 216:1-14). Host cell lysis and thermal
- 30 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

- 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
- 5 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
- 10 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.
- 15 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 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,
- 20 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. 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
- 25 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. 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
- 30 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 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

MACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) and LASERGENE software (DNASTAR). Polynucleotide and polypeptide sequence alignments are generated using default parameters specified by the CLUSTAL algorithm as incorporated into the MEGALIGN multisequence alignment program (DNASTAR), which also calculates the percent

5 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 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

10 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 between two sequences).

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and

15 polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:7-12. Fragments from about 20 to about 4000 nucleotides which are useful in hybridization and amplification technologies are described in Table 4, column 4.

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative neurotransmitter transporters were initially identified by running the Genscan gene

20 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

25 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 neurotransmitter transporters, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for neurotransmitter transporters. Potential neurotransmitter transporters were

30 also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as neurotransmitter transporters. 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.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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
 5 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
 10 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
 15 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 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
 20 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
 25 from genpept. Sequences were further extended with additional cDNA sequences, or by inspection of genomic DNA, when necessary.

"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
 30 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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

5 determine whether it contained a complete gene.

VI. Chromosomal Mapping of NTT Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:7-12 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

10 SEQ ID NO:7-12 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

15 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-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

20 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

25 disease genes map within or in proximity to the intervals indicated above.

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)

30 *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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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:

$$5 \times \frac{\text{BLAST Score} \times \text{Percent Identity}}{\text{minimum \{length(Seq. 1), length(Seq. 2)\}}}$$

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 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 NTT are analyzed with respect to the tissue sources from which they were derived. For example, some full length sequences are assembled, at least 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; hemic and immune system; liver; musculoskeletal system; nervous system; pancreas; respiratory 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 categories. The resulting percentages reflect the tissue- and disease-specific expression of cDNA encoding NTT. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of NTT Encoding Polynucleotides

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Full length polynucleotide sequences were also produced by extension of an appropriate 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

5 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 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

10 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 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 Mg^{2+} , $(NH_4)_2SO_4$, and 2-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE enzyme

15 (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, 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;

20 Step 6: 68°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C.

The concentration of DNA in each well was determined by dispensing 100 μ l PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 μ l 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

25 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 μ l to 10 μ l aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis 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 CviII cholera virus endonuclease (Molecular Biology Research, Madison WI), and

30 sonicated or sheared prior to religation into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For 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,

WO 01/90148

PCT/US01/16283

and transfected into competent *E. coli* cells. Transformed cells were selected on antibiotic-containing 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 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 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

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:7-12 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 -³²P] 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 10⁷ 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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 (Skena (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., Skena, 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. 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.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

(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 μ l 5X SSC/0.2% SDS.

5 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 μ g. 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.

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.

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.

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.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Detection

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
 5 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,
 10 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,
 15 although the apparatus is capable of recording the spectra from both fluorophores simultaneously.

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 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
 20 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
 25 (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
 30 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).

WO 01/90148

PCT/US01/16283

XI. Complementary Polynucleotides

Sequences complementary to the NTT-encoding sequences, or any parts thereof, are used to detect, decrease, or inhibit expression of naturally occurring NTT. 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 NTT. 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 NTT-encoding transcript.

10 XII. Expression of NTT

Expression and purification of NTT is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of NTT 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 NTT upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of NTT 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 NTT 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; Sandlg, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

In most expression systems, NTT 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 NTT 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-

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 NTT obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI and XVII where applicable.

5 XIII. Functional Assays

NTT function is assessed by expressing the sequences encoding NTT 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-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 NTT on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding NTT 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 NTT and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

XIV. Production of NTT Specific Antibodies

NTT 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.

5 Alternatively, the NTT 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.)

10 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-NTT activity by, for example, binding the peptide or NTT to a substrate, blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radio-iodinated goat anti-rabbit IgG.

XV. Purification of Naturally Occurring NTT Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant NTT is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for NTT. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-NTT antibody to an activated chromatographic resin, such as CNBr-activated SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech). After the coupling, the resin is blocked and washed according to the manufacturer's instructions.

Media containing NTT are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of NTT (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/NTT binding (e.g., 25 a buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and NTT is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with NTT

NTT, 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 previously arrayed in the wells of a multi-well plate are incubated with the labeled NTT, washed, and any wells with labeled NTT complex are assayed. Data obtained using different concentrations of NTT are used to calculate values for the number, affinity, and association of NTT with the candidate molecules.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Alternatively, molecules interacting with NTT are analyzed using the yeast two-hybrid 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).

- NTT 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 No. 6,057,101).

XVII. Demonstration of NTT Activity

Measurements of NTT activity include tracer fluxes and electrophysiological approaches.

- Tracer fluxes are demonstrated by measuring uptake of labeled substrates into *Xenopus laevis* oocytes. Oocytes at stages V and VI are injected with NTT mRNA (10 ng per oocyte) and incubated for three days at 18°C in OR2 medium (82.5mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 1mM Na₂HPO₄, 5 mM Hepes, 3.8 mM NaOH, 50µg/ml gentamycin, pH 7.8) to allow expression of NTT protein. Oocytes are then transferred to standard uptake medium (100mM NaCl, 2 mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10 mM Hepes/Tris pH 7.5). Uptake of various neurotransmitters is initiated by adding a ³H substrate to the oocytes. After incubating for 30 minutes, uptake is terminated by washing the oocytes three times in Na⁺-free medium, measuring the incorporated ³H, and comparing with controls. NTT activity is proportional to the level of internalized ³H substrate.

- Alternatively, NTT activity can be demonstrated using an electrophysiological assay for ion conductance. Capped NTT mRNA transcribed with T7 polymerase is injected into defolliculated stage V *Xenopus* oocytes, similar to previously described. Two to seven days later, transport is measured by two-electrode voltage clamp recording. Two-electrode voltage clamp recordings are performed at a holding potential of 50 mV. The data are filtered at 10 Hz and recorded with MacLab digital-to-analog converter and software for data acquisition and analysis (AD Instruments, Castle Hill, Australia). To study the dependence of NTT on external ions, sodium can be replaced by choline or N-methyl-D-glucamine and chloride by gluconate, NO₃, or SO₄ (Kavanaugh, M.P. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:22007-22009).

- In the alternative, choline transporter activity or choline-transporter-like CTL1 protein activity of NTT is determined by measuring choline uptake by yeast transformed with expression vectors harboring polynucleotides encoding NTT. The assay is performed in nitrogen-free medium at 30°C for 10 or 30 min in the presence of 25 nM [³H]choline. The cells are then filtered, and washed. The amount of [³H]choline present in the cells is proportional to the activity of NTT in the cells (O'Regan, S. *supra*).

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.

- 5 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.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
7617689	1	7617689CD1	7	7617689CB1
6881669	2	6881669CD1	8	6881669CB1
2742486	3	2742486CD1	9	2742486CB1
7155695	4	7155695CD1	10	7155695CB1
7472800	5	7472800CD1	11	7472800CB1
7475553	6	7475553CD1	12	7475553CB1

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability score	GenBank Homolog
1	7617689CD1	g202523	0	[Rattus norvegicus] GABA transporter (Horden, L.A. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 21098-21104)
2	6881669CD1	g298324	0	[Rattus sp.] sodium-dependent neurotransmitter transporter (Thi, G.R. et al. (1992) Brain Res. Mol. Brain Res. 16 (3-4), 353-359)
3	2742486CD1	g1314290	2.10E-19	[Homo sapiens] vesicular monoamine transporter VMAT1 (Erickson, J.D. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93 (10), 5166-5171)
4	71556695CD1	g799339	0	[Homo sapiens] taurine transporter (Miyamoto, Y. et al. (1996) Curr. Eye Res. 15 (3), 345-349)
5	7472800CD1	g181656	0	[Homo sapiens] dopamine transporter (Vandenberg, D.J. et al. (1992) Brain Res. Mol. Brain Res. 15 (1-2), 161-166)
6	7475553CD1	g914028	5.70E-300	[Rattus sp.] neurotransmitter transporter rB2la (Smith, K.E. et al. (1995) FEBS Lett. 357 (1), 86-92)

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 3

SEQ ID NO	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
1	7617689CD1	602	S10 T596 T525 T230 T555 T587	N169 N173 N178 N269	Transmembrane Domains: N126-W150 S325-Q341 E478-S360 V426-E345 M454-G472 Sodium:neurotransmitter symporter family (SNF) R32-E570 Sodium:neurotransmitter symporter family BLIMPS_BLOCKS proteins R200610:E40-E89, R104-C153, W206-G257, R277-E324, A365-E407, S464-E516, F524-P346 Sodium:neurotransmitter symporter family PROFILESCAN signatures: N36-T90 Sodium:neurotransmitter symporter signature PR00176:E40-L61, A69-L88, G113-Y139, V233-I250, I315-I335, L369-L388, G453-L473, K493-L513	HMER

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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
1					TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER SYMPORT GLYCOPROTEIN SODIUM CHLORIDE DEPENDENT GABA PD000448-R32-P570 TRANSMEMBRANE TRANSPORT PROTEIN TRANSPORTER AMINO ACID PERMEASE GLYCOPROTEIN MEMBRANE PD000214-A258-F546 SODIUM CHLORIDE DEPENDENT GABA TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER GLYCOPROTEIN SYMPORT MULTIGENE PD037836-T558-C602 SODIUM TRANSMITTER SYMPORTER FAMILY ELAST_DOMO DM00572 P31649 122-576:E22-E577 DM00572 P31649 122-576:E22-E577 DM00572 P48066 40-596:K24-E577 DM00572 P27799 126-581:E22-E576 Sodium neurotransmitter symporter family MOTIFS signature 1: W56-F70 Sodium neurotransmitter symporter family MOTIFS signature 2: Y139-T152	BLAST_PRODOM
2	688166CDL	730	S129 S137 S19 S217 S25 S250 S425 S55 S699 T191 T287 T399 T489 T49 T522 T656 T614	N187 N213 N276 N383 N394	Transmembrane Domains: L100-L117, V335-K359, S460-V483, K494-F512, M572-V589, L619-R640 Sodium neurotransmitter symporter family: R61-R659 Sodium neurotransmitter symporter family ELIMPS_BLOCKS DM000448-R32-P570 G277-T292-T344, A449-R491, N541-S595, L612-P634	HMGR HMDET_PPFAM

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO: 2	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
					Sodium neurotransmitter symporter family signatures: N95-L119	PROFLISCAN
					Sodium neurotransmitter symporter signatures: P00176:069-190, A98-L117, G142-Y168, I253-I270, V335-V355, F453-L472, T430-I550, Y570-V590	BLIMPS_PRINTS
					TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER SYMPORT GLYCOPROTEIN SODIUM CHLORIDE DEPENDENT GABA	BLAST_PRODUM
					P000448:1423-R640, R61-F353	BLAST_PRODUM
					SODIUM CHLORIDE DEPENDENT TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER SYMPORT NT14 NT173	BLAST_PRODUM
					P0037831:N651-D724	BLAST_PRODUM
					SODIUM AND CHLORIDE DEPENDENT TRANSPORTER NT173 NEUROTRANSMITTER	BLAST_PRODUM
					TRANSPORT SYMPORT	BLAST_PRODUM
					P0113985:M1-S60	BLAST_PRODUM
					SODIUM CHLORIDE DEPENDENT TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER SYMPORT NT14 NT173	BLAST_PRODUM
					P0037831:N651-D724	BLAST_PRODUM
					SODIUM NEUROTRANSMITTER SYMPORTER FAMILY	BLAST_DOMO
					DM00572:G04469:151-678:852-8679	
					DM00572:P31662:150-676:852-1677	
					DM00572:S50998:19-616:856-1636	
					DM00572:A48716:183-762:S200-N361	
					Sodium neurotransmitter symporter family signatures Na_Neurotran_Symp_1 W65-Y99	

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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
3	2742486CD1	523	S503 T52 S98 T420 S510 T511 S9 S49 S362 S498		SIMILARITY TO VESICULAR MONOMINE TRANSPORTERS PD075879: E287-H394 VESICULAR MONOMINE TRANSPORTER PD075879: E287-H394 TRANSMEMBRANE DOMAIN: M199-E512 F168-L187, F265-L283, L399-I418 Sodium:neurotransmitter symporter family BL00610: D78-E127, W142-C191, W247-G298, R313-T365, A406-P448, C505-L559, Y555-P587 SODIUM/NEUROTRANSMITTER SYMPORTER FAMILY DM00572 F31649 22-576: Q69-E613 Sodium:neurotransmitter symporter family Sodium:neurotransmitter symporter family S74-L128 SODIUM/NEUROTRANSMITTER SYMPORTER FAMILY SIGNATURE PR00176: D78-L99, A107-L126, G151-Y177, V274-V291, M356-L376, M410-L429, G494-G514, K534-V554 TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER TRANSPORT TRANSMEMBRANE DOMAIN: C191-C249 SODIUM CHLORIDE DEPENDENT SODIUM DEPENDENT GABA PD000448: R70-P611 SODIUM/NEUROTRANSMITTER SYMPORTER FAMILY DM00572 Q00589 31-588: E60-A618 Sodium:neurotransmitter symporter family signature Na_Neurotran_Sym_3: W94-F108 Na_Neurotran_Sym_2: Y177-T197 TRANSMEMBRANE DOMAIN: C191-C249 L109-I128, I418-V436, V495-G513, S536-L553	BLAST-PRODOM BLAST-DMO HMMER
4	71556695CD1	649	S23 T57 S75 T140 N193 N208 T312 S351 S442 N219 N562 T610 S74 T204 S244 T271 S351 T610			BLIMP5-BLOCKS BLAST-DMO HMMER

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 3 (cont.)

SEQ NO:	Incyte ID	Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosyla- tion Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
4						Sodium neurotransmitter symporter family SNP: R70-P611 Transmembrane Domains: L103-P125, L146-P173, A409-A426, F451- N469 Sodium neurotransmitter symporter family: R60-Q386 W410-P594 Sodium neurotransmitter symporter family BL00610:D68-E117, V131-C180, W238- Q289, R304-T356, P400-Q442, T489-P543, P548-P570 Sodium neurotransmitter symporter family: G64-I118 Sodium neurotransmitter symporter signature PRO0176:D68-L89, A97-M116, G140-Y166, V265-L282, I347-F367, S404-I423, R518- V338 TRANSPORTER NEUROTRANSMITTER SYMPORT GLYCOPROTEIN SODIUM CHLORIDE DEPENDENT GABA PD000448:R60-P594 SODIUM DEPENDENT DOPAMINE TRANSPORTER DR DAT NEUROTRANSMITTER SYMPORT PD023333:M1-D59 TRANSMERANE TRANSPORT PROTEIN PERMEASE AMINO ACID GLYCOPROTEIN MEMBRANE PRO0014:L244-L244, L454-L515, L453-A576, W238- S333, V145-S188	HMMER HMMER_Pfam BLAST_PRODUM BLAST_PRODUM

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 3 (cont.)

SRQ ID	Incyte ID	Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
5						SODIUM:NEUROTRANSMITTER SYMPORTER FAMILY DM00572 E27922 49-600: R49-D597 DM00572 F51143 44-598: E56-V601 DM00572 F51162 89-820: F55-L601 DM00572 F51162 89-820: F55-L601 Sodium:neurotransmitter symporter family signatures Na:Neurotran_Symp_1 W84-F98 Na:Neurotran_Symp_2 Y166-S186 Transmembrane Domains: Y83-N103, L174-T199, I277-I297, S392-L415, M508-F524 Sodium:neurotransmitter symporter family signatures: R5-T103, C358-Q580 Sodium:neurotransmitter symporter family ProfileScan A9-L63 Sodium:neurotransmitter: BL00610: W77-C126, W168-G219, Q234-T286, A381-I423, T477-T531, K549-P571, Q13-E62 Sodium:neurotransmitter: BR00172: Q13-L34, S42-L61, C86-Y112, V195-I212, I277-I297, K385-I404, T466-L486, K506-S526 Sodium:neurotransmitter symporter family: DM00572 S50998 19-616: M1-A592 DM00572 Q09469 51-578: M1-A592 DM00572 Q09469 51-578: M1-A592 DM00572 E28570 42-603: R5-C139, D136-T303, A367-R582 Neurotransmitter transporter: PD000448: R5-F300, G257-R582	BLAST-DBO BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-DBO BLAST-PRODOM
6	7475553CD1		592	S116 S159 S264 S314 S331 S362 T133 T192 T229 T497 T533	N131 N357		HMMER HMMER-PFAM ProfileScan BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-DBO BLAST-PRODOM

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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					Orphan neurotransmitter transporter R521A: PDI54252: K301-I360	BLAST-PRODM

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 4

Polynucleotide Seq ID No.	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Region(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
7	7617689CB1	2168	1383-1520	5407696P6 (BRANNOT01)	210	742
	7617689CB1	2168	1383-1520	70501086V1	1342	1949
	7617689CB1	2168	1383-1520	5407696F8	204	711
	7617689CB1	2168	1383-1520	70505706V1	590	1263
	7617689CB1	2168	1383-1520	757515H1	1	222
	7617689CB1	2168	1383-1520	(BRATTUT02)	741	1381
	7617689CB1	2168	1383-1520	70501894V1	1545	2168
	7617689CB1	2168	1383-1520	70505220V1	1369	1967
	7617689CB1	2168	1383-1520	70501380V1	483	616
	7617689CB1	2168	1383-1520	(BRPIVNA01)	580	1179
8	6881669CB1	2709	2539-2709, 74-	7186875H1	580	1179
	6881669CB1	2709	93, 330-610	(BRATUXR02)	113	868
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74-	GHI:96881669_edit	784	1392
	6881669CB1	2709	93, 330-610	4761061P8 (BRANNOT01)	1	270
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74-	7372128H2	1328	1953
	6881669CB1	2709	93, 330-610	(BRATUXR04)	1836	2709
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74-	5504608H1	1735	2174
	6881669CB1	2709	93, 330-610	5914742P6 (PTTUDIR01)	1	216
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74-	2289873R6 (BRANNOT01)	2549	2958
	6881669CB1	2709	93, 330-610	4181117H1 (STNTTUT03)	1109	1730
9	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	9820961 (1)	749	1345
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2896553P6 (KIDNUTU14)	1599	2161
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	7117217H1	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(BRANNOT01)		
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2419627R6 (SCORNON02)		
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	2419627T6		
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(SCORNON02)		
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495			
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495			
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495			
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495			

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 4

Polynucleotide Seq ID No:	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
7	7617689CB1	2168	1383-1520	54076856 (BRAMN0701)	210	742
	7617689CB1	2168	1383-1520	7050186V1 (BRAMN0701)	1342	1949
	7617689CB1	2168	1383-1520	540768628 (BRAMN0701)	204	711
	7617689CB1	2168	1383-1520	70505706V1 (BRAMN0701)	590	1263
	7617689CB1	2168	1383-1520	757515H1 (BRAITUT02)	1	222
	7617689CB1	2168	1383-1520	70501894V1 (BRAITUT02)	741	1381
	7617689CB1	2168	1383-1520	70505220V1 (BRAITUT02)	1545	2168
	7617689CB1	2168	1383-1520	70501380V1 (BRAITUT02)	1369	1987
	7617689CB1	2168	1383-1520	62282440V1 (BRAITUT02)	483	616
	7617689CB1	2168	1383-1520	70505706V1 (BRAITUT02)	590	1263
8	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	7186675H1 (BRAMN0701)	580	1179
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	GBR166881669_edit (BRAMN0701)	113	868
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	4761061F8 (BRAMN0701)	784	1392
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	7372128H2 (BRAMN0701)	1	270
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	55046086H1 (BRAMN0701)	1328	1953
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	691474256 (BRAMN0701)	1836	2709
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	228987386 (BRAMN0701)	1735	2174
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	418117H1 (BRAMN0701)	1	216
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	9820961 () (BRAMN0701)	2549	2958
	6881669CB1	2709	2539-2709, 74- 93, 330-610	289553386 (BRAMN0701)	1109	1730
9	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	7117217H1 (BRAMN0701)	749	1245
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	1599	2161
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	241962786 (BRAMN0701)	2289	2949

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Polynucleotide Seq. ID No.	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
10	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	55047291H1	533	839
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	5777360H1	2397	2950
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(BRALRO20)	163	836
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	5504729301	1791	2356
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	139815876	1526	2135
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(BRALRUT08)	1142	1484
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(BRABDIK02)	273	2135
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(CHYNDI501)	504	1178
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(BRALRO20)	1	587
	2742486CB1	2958	1-50, 2756-2816, 498-1495	(HEARFE03)	1	598
11	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	(BRAGNON02)	120	1997
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	FL7472800_g7108462_	1	1812
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	9181656	2091	2774
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	FL7475553_g3702356_	1	1812
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	914038	2091	2774
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	70646995V1	1844	2494
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	71867729V1	1790	2441
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	71869071V1	1790	2441
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	71869071V1	1790	2441
	7472800CB1	1997	1339-1469, 1- 116, 1576-1607, 893-1145, 1950- 1997, 689-744	71869071V1	1790	2441
12	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	FL7475553_g3702356_	1	1812
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	914038	2091	2774
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	70646995V1	1844	2494
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71867729V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441
	7475553CB1	2774	1-259, 2047- 2318, 2715-2774	71869071V1	1790	2441

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Project ID	Representative Library
7	7617689CB1	BRATUT02
8	6881669CB1	BRABDI02
9	2742486CB1	BRSTUT14
10	71556695CB1	DRGTN001
11	7472800CB1	BRAGN002
12	7475533CB1	BRAIN009

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 6

Library	Vector	Library Description
BRAQNR02	P1NCY	This normalized substantia nigra tissue library was constructed from 4.2×10^7 independent clones from a substantia nigra tissue library. Starting RNA was made from RNA isolated from substantia nigra tissue removed from an 81-year-old Caucasian female who died from a hemorrhage and ruptured fusiform aorta due to atherosclerosis. Pathological findings included bilateral infarcts of the internal carotids; bilaterally; microscopic infarcts of the frontal cortex and hippocampus; and scattered diffuse amyloid plaques and neurofibrillary tangles, consistent with age. Grossly, the leptomeninges showed only mild thickening and hyalinization along the superior sagittal sinus. The remainder of the leptomeninges was thin and contained some congested blood vessels. Mild atrophy was found mostly in the frontal poles and lobes, and temporal lobes, bilaterally. Microscopically, there were pairs of Alzheimer type II astrocytes within the deep layers of the neocortex. There was increased satellitosis around neurons in the hippocampus and cerebellum. The posterior hippocampus contained a diffuse plaque and neurofibrillary tangles. The posterior hippocampus contained a microscopic area of cystic cavitation with hemosiderin-laden macrophages surrounded by reactive gliosis. Patient history included sepsis, cholangitis, post-operative atelectasis, pneumonia CAD, cardiomegaly due to left ventricular hypertrophy, splenomegaly, arteriolonephrosclerosis, nodular colloid goiter, emphysema, CHF, hypothyroidism, and peripheral vascular disease. The library was constructed using RNA isolated from the brain of a 57-year-old Caucasian male who died from a cerebrovascular accident. Serologies were negative. Patient history included Huntington's disease, emphysema, and tobacco abuse (3-4 packs per day for 40 years).
BRAADIR02	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. Serologies were negative. Patient history included Huntington's disease, emphysema, and tobacco abuse (3-4 packs per day for 40 years).
BRAINOT09	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from brain tumor tissue removed from a Caucasian male fetus, who died at 23 weeks' gestation.
BRAITUT02	PSPORT1	Library was constructed using RNA isolated from brain tumor tissue removed from a Caucasian male fetus, who died at 23 weeks' gestation. Patient history included a meningeal lesion. Pathology indicated a grade 2 metastatic hypernephroma. Patient history included a grade 2 renal cell carcinoma, insomnia, and chronic airway obstruction. Family history included a malignant neoplasm of the kidney.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
BRSTUM14	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from breast tumor tissue removed from a 62-year-old Caucasian female during a unilateral extended simple mastectomy. Pathology indicated an invasive grade 3 (of 4), nuclear grade 3 (of 3) adenocarcinoma, ductal type. Ductal carcinoma in situ, comedo type, comprised 60% of the tumor mass. Metastatic adenocarcinoma was identified in one (of 14) axillary lymph nodes with no perinodal extension. Tumor cells were strongly positive for estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2/neu receptors. Patient history included benign colon neoplasia, hyperlipidemia, cardiac dysrhythmia, and obesity. Family history included atherosclerotic coronary artery disease, myocardial infarction, colon cancer, ovarian cancer, lung cancer, and cerebrovascular disease.
DRGTN0701	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from dorsal root ganglion tissue removed from the thoracic spine of a 32-year-old Caucasian male who died from acute pulmonary edema and bronchopneumonia, bilateral pleural and pericardial effusions, and malignant lymphoma (nodular, mixed cell type). Patient history included chronic alcohol abuse, chronic obstructive pulmonary disease, splenomegaly, hemorrhagic cystitis, thyroid hemorrhage, and Bell's palsy. Surgeries included colonoscopy, large intestine biopsy, adenotomylectomy, and nasopharyngeal endoscopy and biopsy. Treatment included radiation therapy.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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 RDF	A Fast Data Finder useful in comparing and associating amino acid or nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA; Percec 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) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs: Probability value= 1.0E-8 or less Full Length sequences: 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, ufasta, fastx, tfastx, and search.	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; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	ESTs: fasta E value=1.0E-6 Assembled ESTs: fasta Identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fasta E value=1.0E-8 or less Full Length sequences: fastx score=100 or greater
BLIMPS	A BLocks IMProved Searcher that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DDB, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; and Atwood, T.K. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 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) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) One World View in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM hits: Probability value= 1.0E-3 or less Signal peptide hits: Score= 0 or greater

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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.	Gribskov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Baicovich, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality scores GCS-specified "HISPR" 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) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green. (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	A Phils 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) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	Score= 120 or greater; Match length= 56 or greater
Cnased	A graphical tool for viewing and editing Phrap assemblies.	Gordon, D. et al. (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SFSscan	A weight matrix analysis program that scans protein sequences for the presence of secretory signal peptides.	Nielson, H. et al. (1997) Protein Engineering 10:1-6; Clavette, J.M. and S. Audie (1997) CABIOS 12:431-439.	Score=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) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. and P. Argos (1996) Protein Sci. 5:365-371.	
TMHMMER	A program that uses a hidden Markov model (HMM) to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Sonnhammer, E.L. et al. (1998) Proc. Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol. Biol., 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.	Baichov, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59; Genetics Computer Group, Madison, WI.	

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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:1-6,
 - 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:1-6,
 - c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected
from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, and
 - 10 d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from
the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
- 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:7-12.
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
 - b) recovering the polypeptide so expressed.
- 35

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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:7-12,
- 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:7-12,
- 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.

15 13. 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) 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.

25 14. A method of claim 13, wherein the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

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 01/90148

PCT/US01/16283

17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.

18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional NTT, 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:
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.

21. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional NTT, 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:
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.

24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional NTT, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 23.

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 01/90148

PCT/US01/16283

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:
- 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
 - 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:
- 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
 - 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;
 - 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;
 - 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 01/90148

PCT/US01/16283

29. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of NTT 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
 - e) a humanized antibody.
- 15 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 NTT 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 NTT 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:1-6, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;
 - b) isolating antibodies from said animal; and

WO 01/90148

PCT/US01/16283

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:1-6.

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 10 comprising:

a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6, 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:1-6.

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:1-6 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 01/90148

PCT/US01/16283

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:1-6 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:1-6 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 amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-6.
- 10 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 polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:7.
- 25 52. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:8.
53. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide 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 01/90148

PCT/US01/16283

56. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12.

WO 01/90148

PCT/US01/16283

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 SANJANWALA, Madhu S.
 WALIA, Narinder K.
 TRIBOULEY, Catherine M.
 YUE, Henry
 GRANDHI, Amsena R.
 DING, Li
 YAO, Monique G.
 LAL, Preeti
 BAUGHN, Mariah R.
 HAFALIA, April
 ELLIOTT, Vicki S.
 PATTERSON, Chandra
 RAMKUMAR, Jaya

<120> NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS

<130> PI-0101 PCT

<140> To Be Assigned
 <141> Herewith

<150> 60/205,518; 60/213,956; 60/215,105; 60/218,947; 60/218,947
 <151> 2000-05-19; 2000-06-22; 2000-06-28; 2000-07-14; 2000-07-14

<160> 12
 <170> PERL Program

<210> 1
 <211> 602
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7617689CD1

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

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

215      220      225
Gly Val Lys Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe
230      235      240
Pro Tyr Leu Met Leu Val Val Leu Leu Ile Arg Gly Val Thr Leu
245      250      255
Pro Gly Ala Ala Gln Gly Ile Gln Phe Tyr Leu Tyr Pro Asn Leu
260      265      270
Thr Arg Leu Trp Asp Pro Gln Val Trp Met Asp Ala Gly Thr Gln
275      280      285
Ile Phe Phe Ser Phe Ala Ile Cys Leu Gly Cys Leu Thr Ala Leu
290      295      300
Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr His Asn Asn Cys Tyr Arg Asp Cys Ile
305      310      315
Ala Leu Cys Phe Leu Asn Ser Gly Thr Ser Phe Val Ala Gly Phe
320      325      330
Ala Ile Phe Ser Ile Leu Gly Phe Met Ser Gln Glu Gln Gly Val
335      340      345
Pro Ile Ser Glu Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Ala Phe Ile
350      355      360
Ala Tyr Pro Arg Ala Val Val Met Leu Pro Phe Ser Pro Leu Trp
365      370      375
Ala Cys Cys Phe Phe Phe Met Val Val Leu Leu Gly Leu Asp Ser
380      385      390
Gln Phe Val Cys Val Glu Ser Leu Val Thr Ala Leu Val Asp Met
395      400      405
Tyr Pro His Val Phe Arg Lys Lys Asn Arg Arg Glu Val Leu Ile
410      415      420
Leu Gly Val Ser Val Val Ser Phe Leu Val Gly Leu Ile Met Leu
425      430      435
Thr Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala
440      445      450
Ala Ser Gly Met Cys Leu Leu Phe Val Ala Ile Phe Glu Ser Leu
455      460      465
Cys Val Ala Trp Val Tyr Gly Ala Lys Arg Phe Tyr Asp Asn Ile
470      475      480
Glu Asp Met Ile Gly Tyr Arg Pro Trp Pro Leu Ile Lys Tyr Cys
485      490      495
Trp Leu Phe Leu Thr Pro Ala Val Cys Thr Ala Thr Phe Leu Phe
500      505      510
Ser Leu Ile Lys Tyr Thr Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Lys Tyr Thr
515      520      525
Tyr Pro Trp Trp Gly Asp Ala Leu Gly Trp Leu Leu Ala Leu Ser
530      535      540
Ser Met Val Cys Ile Pro Ala Trp Ser Leu Tyr Arg Leu Gly Thr
545      550      555
Leu Lys Gly Pro Phe Arg Glu Arg Ile Arg Gln Leu Met Cys Pro
560      565      570
Ala Glu Asp Leu Pro Gln Arg Asn Pro Ala Gly Pro Ser Ala Pro
575      580      585
Ala Thr Pro Arg Thr Ser Leu Leu Arg Leu Thr Glu Leu Glu Ser
590      595      600
His Cys

```

```

<210> 2
<211> 730
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 6881669CD1

```

```

<400> 2
Met Pro Lys Asn Ser Lys Val Val Lys Arg Glu Leu Asp Asp Asp
1      5      10      15
Val Thr Glu Ser Val Lys Asp Leu Leu Ser Asn Glu Asp Ala Ala

```

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

20      25      30
Asp Asp Ala Phe Lys Thr Ser Glu Leu Ile Val Asp Gly Gln Glu
35      40      45
Glu Lys Asp Thr Asp Val Glu Glu Gly Ser Glu Val Glu Asp Glu
50      55      60
Arg Pro Ala Trp Asn Ser Lys Leu Gln Tyr Ile Leu Ala Gln Val
65      70      75
Gly Phe Ser Val Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro Tyr Leu
80      85      90
Cys Gln Lys Asn Gly Gly Gly Ala Tyr Leu Leu Pro Tyr Leu Ile
95      100     105
Leu Leu Met Val Ile Gly Ile Pro Leu Phe Phe Leu Glu Leu Ser
110     115     120
Val Gly Gln Arg Ile Arg Arg Gly Ser Ile Gly Val Trp Asn Tyr
125     130     135
Ile Ser Pro Lys Leu Gly Gly Ile Gly Phe Ala Ser Cys Val Val
140     145     150
Cys Tyr Phe Val Ala Leu Tyr Tyr Asn Val Ile Ile Gly Trp Ser
155     160     165
Leu Phe Tyr Phe Ser Gln Ser Phe Gln Gln Pro Leu Pro Trp Asp
170     175     180
Glu Cys Pro Leu Val Lys Asn Ala Ser His Thr Phe Val Glu Pro
185     190     195
Glu Cys Glu Gln Ser Ser Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Arg Glu
200     205     210
Ala Leu Asn Ile Ser Ser Ser Ile Ser Glu Ser Gly Gly Leu Asn
215     220     225
Trp Lys Met Thr Ile Cys Leu Leu Ala Ala Trp Val Met Val Cys
230     235     240
Leu Ala Met Ile Lys Gly Ile Gln Ser Ser Gly Lys Ile Ile Tyr
245     250     255
Phe Ser Ser Leu Phe Pro Tyr Val Val Leu Ile Cys Phe Leu Ile
260     265     270
Arg Ala Phe Leu Leu Asn Gly Ser Ile Asp Gly Ile Arg His Met
275     280     285
Phe Thr Pro Lys Leu Glu Ile Met Leu Glu Pro Lys Val Trp Arg
290     295     300
Glu Ala Ala Thr Gln Val Phe Phe Ala Leu Gly Leu Gly Phe Gly
305     310     315
Gly Val Ile Ala Phe Ser Ser Tyr Asn Lys Arg Asp Asn Asn Cys
320     325     330
His Phe Asp Ala Val Leu Val Ser Phe Ile Asn Phe Phe Thr Ser
335     340     345
Val Leu Ala Thr Leu Val Val Phe Ala Val Leu Gly Phe Lys Ala
350     355     360
Asn Val Ile Asn Glu Lys Cys Ile Thr Gln Asn Ser Glu Thr Ile
365     370     375
Met Lys Phe Leu Lys Met Gly Asn Ile Ser Gln Asp Ile Ile Pro
380     385     390
His His Ile Asn Leu Ser Thr Val Thr Ala Glu Asp Tyr His Leu
395     400     405
Val Tyr Asp Ile Ile Gln Lys Val Lys Glu Glu Glu Phe Pro Ala
410     415     420
Leu His Leu Asn Ser Cys Lys Ile Glu Glu Glu Leu Asn Lys Ala
425     430     435
Val Gln Gly Thr Gly Leu Ala Phe Ile Ala Phe Thr Glu Ala Met
440     445     450
Thr His Phe Pro Ala Ser Pro Phe Trp Ser Val Met Phe Phe Leu
455     460     465
Met Leu Val Asn Leu Gly Leu Gly Ser Met Phe Gly Thr Ile Glu
470     475     480
Gly Ile Val Thr Pro Ile Val Asp Thr Phe Lys Val Arg Lys Glu
485     490     495
Ile Leu Thr Val Ile Cys Cys Leu Leu Ala Phe Cys Ile Gly Leu
500     505     510
Ile Phe Val Gln Arg Ser Gly Asn Tyr Phe Val Thr Met Phe Asp
515     520     525

```

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

Asp Tyr Ser Ala Thr Leu Pro Leu Leu Ile Val Val Ile Leu Glu
530 535 540
Asn Ile Ala Val Cys Phe Val Tyr Gly Ile Asp Lys Phe Met Glu
545 550 555
Asp Leu Lys Asp Met Leu Gly Phe Ala Pro Ser Arg Tyr Tyr Tyr
560 565 570
Tyr Met Trp Lys Tyr Ile Ser Pro Leu Met Leu Leu Ser Leu Leu
575 580 585
Ile Ala Ser Val Val Asn Met Gly Leu Ser Pro Pro Gly Tyr Asn
590 595 600
Ala Trp Ile Glu Asp Lys Ala Ser Glu Glu Phe Leu Ser Tyr Pro
605 610 615
Thr Trp Gly Leu Val Val Cys Val Ser Leu Val Val Phe Ala Ile
620 625 630
Leu Pro Val Pro Val Val Phe Ile Val Arg Arg Phe Asn Leu Ile
635 640 645
Asp Asp Ser Ser Gly Asn Leu Ala Ser Val Thr Tyr Lys Arg Gly
650 655 660
Arg Val Leu Lys Glu Pro Val Asn Leu Glu Gly Asp Asp Thr Ser
665 670 675
Leu Ile His Gly Lys Ile Pro Ser Glu Met Pro Ser Pro Asn Phe
680 685 690
Gly Lys Asn Ile Tyr Arg Lys Gln Ser Gly Ser Pro Thr Leu Asp
695 700 705
Thr Ala Pro Asn Gly Arg Tyr Gly Ile Gly Tyr Leu Met Ala Asp
710 715 720
Ile Met Pro Asp Met Pro Glu Ser Asp Leu
725 730

```

```

<210> 3
<211> 523
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2742486CD1

```

```

<400> 3
Met Gln Asp Cys Gly Asp Pro Glu Ser Trp Lys Ala Leu Gly Ser
1 5 10 15
Ser Gly Pro Gly Gly Ser Leu Pro Ala Gly Ser Arg Gly Cys Gln
20 25 30
Val Pro Ala Glu Gln Arg Pro Pro Ala Arg Val Pro Val Ala Pro
35 40 45
Trp Arg Ser Ser Pro Arg Thr Trp Leu Glu Ala Gly Ser Trp Gly
50 55 60
Ala Gly Val His Ala Pro Gly Met Glu Ala Leu Gly Asp Leu Glu
65 70 75
Gly Pro Arg Ala Pro Gly Gly Asp Asp Pro Ala Gly Ser Ala Gly
80 85 90
Glu Thr Pro Gly Trp Leu Ser Arg Glu Gln Val Phe Val Leu Ile
95 100 105
Ser Ala Ala Ser Val Asn Leu Gly Ser Met Met Cys Tyr Ser Ile
110 115 120
Leu Gly Pro Phe Phe Pro Lys Glu Ala Glu Lys Lys Gly Ala Ser
125 130 135
Asn Thr Ile Ile Gly Met Ile Phe Gly Cys Phe Ala Leu Phe
140 145 150
Leu Leu Ala Ser Leu Val Phe Gly Asn Tyr Leu Val His Ile Gly
155 160 165
Ala Lys Phe Met Phe Val Ala Gly Met Phe Val Ser Gly Gly Val
170 175 180
Thr Ile Leu Phe Gly Val Leu Asp Arg Val Pro Asp Gly Pro Val
185 190 195
Phe Ile Ala Met Cys Phe Leu Val Arg Val Met Asp Ala Val Ser
200 205 210

```

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

Phe Ala Ala Ala Met Thr Ala Ser Ser Ser Ile Leu Ala Lys Ala
215 220 225
Phe Pro Asn Asn Val Ala Thr Val Leu Gly Ser Leu Glu Thr Phe
230 235 240
Ser Gly Leu Gly Leu Ile Leu Gly Pro Pro Val Gly Gly Phe Leu
245 250 255
Tyr Gln Ser Phe Gly Tyr Glu Val Pro Phe Ile Val Leu Gly Cys
260 265 270
Val Val Leu Leu Met Val Pro Leu Asn Met Tyr Ile Leu Pro Asn
275 280 285
Tyr Glu Ser Asp Pro Gly Glu His Ser Phe Trp Lys Leu Ile Ala
290 295 300
Leu Pro Lys Val Gly Leu Ile Ala Phe Val Ile Asn Ser Leu Ser
305 310 315
Ser Cys Phe Gly Phe Leu Asp Pro Thr Leu Ser Leu Phe Val Leu
320 325 330
Glu Lys Phe Asn Leu Pro Ala Gly Tyr Val Gly Leu Val Phe Leu
335 340 345
Gly Met Ala Leu Ser Tyr Ala Ile Ser Ser Pro Leu Phe Gly Leu
350 355 360
Leu Ser Asp Lys Arg Pro Pro Leu Arg Lys Trp Leu Leu Val Phe
365 370 375
Gly Asn Leu Ile Thr Ala Gly Cys Tyr Met Leu Leu Gly Pro Val
380 385 390
Pro Ile Leu His Ile Lys Ser Gln Leu Trp Leu Leu Val Leu Ile
395 400 405
Leu Val Val Ser Gly Leu Ser Ala Gly Met Ser Ile Ile Pro Thr
410 415 420
Phe Pro Glu Ile Leu Ser Cys Ala His Glu Asn Gly Phe Glu Glu
425 430 435
Gly Leu Ser Thr Leu Gly Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Ala Met
440 445 450
Gly Ser Ile Gly Ala Phe Met Gly Pro Thr Leu Gly Gly Phe Leu
455 460 465
Tyr Glu Lys Ile Gly Phe Glu Trp Ala Ala Ala Ile Gln Gly Leu
470 475 480
Trp Ala Leu Ile Ser Gly Leu Ala Met Gly Leu Phe Tyr Leu Leu
485 490 495
Glu Tyr Ser Arg Arg Lys Arg Ser Lys Ser Gln Asn Ile Leu Ser
500 505 510
Thr Glu Glu Glu Arg Thr Thr Leu Leu Pro Asn Glu Thr
515 520

```

<210> 4
 <211> 649
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 71556695CD1

 <400> 4
 Met Cys Ala Glu Ser Ala Asp Gly Ala Ala Leu Gly Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Gly Cys Gly Asn Arg Pro Pro Ser Thr Gln Glu Ser Lys Glu Met
 20 25 30
 Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 35 40 45
 Ile Leu Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu
 50 55 60
 Asp Glu Ala Glu Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser
 65 70 75
 Lys Ile Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu
 80 85 90
 Gly Asn Val Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly
 95 100 105

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Gly Ala Phe Leu Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly
 110 115 120
 Leu Pro Val Phe Phe Leu Glu Ile Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser
 125 130 135
 Glu Gly Gly Ile Thr Cys Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser
 140 145 150
 Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Val Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val
 155 160 165
 Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe Gln
 170 175 180
 Ser Phe Gln Lys Glu Leu Pro Trp Ala His Cys Asn His Ser Trp
 185 190 195
 Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Met Arg Lys Asn Lys Ser
 200 205 210
 Val Trp Ile Thr Ile Ser Ser Thr Asn Phe Thr Ser Pro Val Ile
 215 220 225
 Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ile Asp
 230 235 240
 His Pro Gly Ser Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu Leu Leu
 245 250 255
 Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Trp Lys Gly Val Arg Ser
 260 265 270
 Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met
 275 280 285
 Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly
 290 295 300
 Ala Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Thr Arg Leu Glu
 305 310 315
 Asp Pro Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser
 320 325 330
 Tyr Ala Ile Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn
 335 340 345
 Lys Tyr Lys Tyr Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys
 350 355 360
 Leu Asn Ser Gly Thr Ser Phe Val Ser Gly Phe Ala Ile Phe Ser
 365 370 375
 Ile Leu Gly Phe Met Ala Gln Glu Gln Gly Val Asp Ile Ala Asp
 380 385 390
 Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Lys
 395 400 405
 Ala Val Thr Met Met Pro Leu Pro Thr Phe Trp Ser Ile Leu Phe
 410 415 420
 Phe Ile Met Leu Leu Leu Gly Leu Asp Ser Gln Phe Val Glu
 425 430 435
 Val Glu Gly Gln Ile Thr Ser Leu Val Asp Leu Tyr Pro Ser Phe
 440 445 450
 Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu Ile Phe Ile Ala Phe Val Cys
 455 460 465
 Ser Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Thr Met Val Thr Glu Gly Gly
 470 475 480
 Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser Gly Val
 485 490 495
 Cys Leu Leu Trp Val Ala Phe Phe Glu Cys Phe Val Ile Ala Trp
 500 505 510
 Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile
 515 520 525
 Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Ala Val Ile
 530 535 540
 Thr Pro Val Leu Cys Val Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys
 545 550 555
 Tyr Val Pro Leu Thr Tyr Asn Lys Thr Tyr Val Tyr Pro Asn Trp
 560 565 570
 Ala Ile Gly Leu Gly Trp Ser Leu Ala Leu Ser Ser Met Leu Cys
 575 580 585
 Val Pro Leu Val Ile Val Ile Arg Leu Cys Gln Thr Glu Gly Pro
 590 595 600
 Phe Leu Val Arg Val Lys Tyr Leu Leu Thr Pro Arg Glu Pro Asn

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Arg	Trp	Ala	Val	Glu	Arg	Glu	Gly	Ala	Thr	Pro	Tyr	Asn	Ser	Arg
605														615
Thr	Val	Met	Asn	Gly	Ala	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	His	Ile	Ile	Val
620														630
Glu	Thr	Met	Met											645
635														640

<210> 5.
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7472800CD1

<220>
 <221> unsure
 <222> 564
 <223> unknown or other

<400> 5
 Met Ser Lys Ser Lys Cys Ser Val Gly Leu Met Ser Ser Val Val
 1 5 10 15
 Ala Pro Ala Lys Glu Pro Asn Ala Val Gly Pro Lys Glu Val Glu
 20 25 30
 Leu Ile Leu Val Lys Glu Gln Asn Gly Val Gln Leu Thr Ser Ser
 35 40 45
 Thr Leu Thr Asn Pro Arg Gln Ser Pro Val Glu Ala Gln Asp Arg
 50 55 60
 Glu Thr Trp Gly Lys Lys Ile Asp Phe Leu Leu Ser Val Ile Gly
 65 70 75
 Phe Ala Val Asp Leu Ala Asn Val Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys
 80 85 90
 Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu Val Pro Tyr Leu Leu Phe
 95 100 105
 Met Val Ile Ala Gly Met Pro Leu Phe Tyr Met Glu Leu Ala Leu
 110 115 120
 Gly Gln Phe Asn Arg Glu Gly Ala Ala Gly Val Trp Lys Ile Cys
 125 130 135
 Pro Ile Leu Lys Gly Val Gly Phe Thr Val Ile Leu Ile Ser Leu
 140 145 150
 Tyr Val Gly Phe Phe Tyr Asn Val Ile Ile Ala Trp Ala Leu His
 155 160 165
 Tyr Leu Phe Ser Ser Phe Thr Thr Glu Leu Pro Trp Ile His Cys
 170 175 180
 Asn Asn Ser Trp Asn Ser Pro Asn Cys Ser Asp Ala His Pro Gly
 185 190 195
 Asp Ser Ser Gly Asp Ser Ser Gly Leu Asn Asp Thr Phe Gly Thr
 200 205 210
 Thr Pro Ala Ala Glu Tyr Phe Glu Arg Gly Val Leu His Leu His
 215 220 225
 Gln Ser His Gly Ile Asp Asp Leu Gly Pro Pro Arg Trp Gln Leu
 230 235 240
 Thr Ala Cys Leu Val Leu Val Ile Val Leu Leu Tyr Phe Ser Leu
 245 250 255
 Trp Lys Gly Val Lys Thr Ser Gly Lys Val Val Trp Ile Thr Ala
 260 265 270
 Thr Met Pro Tyr Val Val Leu Thr Ala Leu Leu Arg Gly Val
 275 280 285
 Thr Leu Pro Gly Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ala Tyr Leu Ser Val
 290 295 300
 Asp Phe Tyr Arg Leu Cys Glu Ala Ser Val Trp Ile Asp Ala Ala
 305 310 315
 Thr Gln Val Cys Phe Ser Leu Gly Val Gly Phe Gly Val Leu Ile
 320 325 330

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Ala Phe Ser Ser Tyr Asn Lys Phe Thr Asn Asn Cys Tyr Arg Asp
 335 340 345
 Ala Ile Val Thr Thr Ser Ile Asn Ser Leu Thr Ser Phe Ser Ser
 350 355 360
 Gly Phe Val Val Phe Ser Phe Leu Gly Tyr Met Ala Gln Lys His
 365 370 375
 Ser Val Pro Ile Gly Asp Val Ala Lys Asp Gly Glu Pro Leu Leu
 380 385 390
 Leu His Leu Gly Leu Leu Arg Val Ala Pro Ala Pro Ser Ser Gln
 395 400 405
 Gln Thr Ser Ala Trp Ala Val Val Phe Phe Ile Met Leu Leu Thr
 410 415 420
 Leu Gly Ile Asp Ser Ala Met Gly Gly Met Glu Ser Val Ile Thr
 425 430 435
 Gly Leu Ile Asp Glu Phe Gln Leu Leu His Arg His Arg Glu Leu
 440 445 450
 Phe Thr Leu Phe Ile Val Leu Ala Thr Phe Leu Leu Ser Leu Phe
 455 460 465
 Cys Val Thr Asn Gly Gly Ile Tyr Val Phe Thr Leu Leu Asp His
 470 475 480
 Phe Ala Ala Gly Thr Leu Met Asp Thr Asp Ala Thr Ser Ser Pro
 485 490 495
 Ser Gly Val Gly Gln Phe Ser Asp Asp Ile Gln Gln Met Thr Gly
 500 505 510
 Gln Arg Pro Ser Leu Tyr Trp Arg Leu Cys Trp Lys Leu Val Ser
 515 520 525
 Pro Cys Phe Leu Leu Phe Val Val Val Val Ser Ile Val Thr Phe
 530 535 540
 Arg Pro Pro His Tyr Gly Ala Tyr Ile Phe Pro Asp Trp Ala Asn
 545 550 555
 Ala Leu Gly Trp Val Ile Ala Thr Xaa Ser Met Ala Met Val Pro
 560 565 570
 Ile Tyr Ala Ala Tyr Lys Phe Cys Ser Leu Pro Gly Ser Phe Arg
 575 580 585
 Glu Lys Leu Ala Tyr Ala Ile Ala Pro Glu Lys Asp Arg Glu Leu
 590 595 600
 Val Asp Arg Gly Glu Val Arg Gln Phe Thr Val Arg Ser Arg Ser
 605 610 615
 Leu Leu Gly Leu Ser Arg Gly Asn Ser Glu 620 625

<210> 6
 <211> S92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7475553CD1

<400> 6
 Met Glu Lys Ala Arg Pro Leu Trp Ala Asn Ser Leu Gln Phe Val
 1 5 10 15
 Phe Ala Cys Ile Ser Tyr Ala Val Gly Leu Gly Asn Val Trp Arg
 20 25 30
 Phe Pro Tyr Leu Cys Gln Met Tyr Gly Gly Ser Phe Leu Val
 35 40 45
 Pro Tyr Ile Ile Met Leu Ile Val Glu Gly Met Pro Leu Leu Tyr
 50 55 60
 Leu Glu Leu Ala Val Gly Gln Arg Met Arg Gln Gly Ser Ile Gly
 65 70 75
 Ala Trp Arg Thr Ile Ser Pro Tyr Leu Ser Gly Val Gly Val Ala
 80 85 90
 Ser Val Val Val Ser Phe Phe Leu Ser Met Tyr Tyr Asn Val Ile
 95 100 105
 Asn Ala Trp Ala Phe Trp Tyr Leu Phe His Ser Phe Gln Asp Pro
 110 115 120

WO 01/90148

PCT/US01/16283

Leu Pro Trp Ser Val Cys Pro Leu Asn Gly Asn His Thr Gly Tyr
 125 130 135
 Asp Glu Glu Cys Glu Lys Ala Ser Ser Thr Gln Tyr Phe Trp Tyr
 140 145 150
 Arg Lys Thr Leu Asn Ile Ser Pro Ser Leu Gln Glu Asn Gly Gly
 155 160 165
 Val Gln Trp Glu Pro Ala Leu Cys Leu Leu Leu Ala Trp Leu Val
 170 175 180
 Val Tyr Leu Cys Ile Leu Arg Gly Thr Glu Ser Thr Gly Lys Val
 185 190 195
 Val Tyr Phe Thr Ala Ser Leu Pro Tyr Cys Val Leu Ile Ile Tyr
 200 205 210
 Leu Ile Arg Gly Leu Thr Leu His Gly Ala Thr Asn Gly Leu Met
 215 220 225
 Tyr Met Phe Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 230 235 240
 Trp Ile Asn Ala Ala Thr Gln Ile Phe Phe Ser Leu Gly Leu Gly
 245 250 255
 Phe Gly Ser Leu Ile Ala Phe Ala Ser Tyr Asn Glu Pro Ser Asn
 260 265 270
 Asn Cys Gln Lys His Ala Ile Ile Val Ser Leu Ile Asn Ser Phe
 275 280 285
 Thr Ser Ile Phe Ala Ser Ile Val Thr Phe Ser Ile Tyr Gly Phe
 290 295 300
 Lys Ala Thr Phe Asn Tyr Glu Asn Cys Leu Lys Lys Val Ser Leu
 305 310 315
 Leu Leu Thr Asn Thr Phe Asp Leu Glu Asp Gly Phe Leu Thr Ala
 320 325 330
 Ser Asn Leu Glu Gln Val Lys Gly Tyr Leu Ala Ser Ala Tyr Pro
 335 340 345
 Ser Lys Tyr Ser Glu Met Phe Pro Gln Ile Lys Asn Cys Ser Leu
 350 355 360
 Glu Ser Glu Leu Asp Thr Ala Val Gln Gly Thr Gly Leu Ala Phe
 365 370 375
 Ile Val Tyr Thr Glu Ala Ile Lys Asn Met Glu Val Ser Gln Leu
 380 385 390
 Trp Ser Val Leu Tyr Phe Phe Met Leu Leu Met Leu Gly Ile Gly
 395 400 405
 Ser Met Leu Gly Asn Thr Ala Ala Ile Leu Thr Pro Leu Thr Asp
 410 415 420
 Ser Lys Ile Ile Ser Ser His Leu Pro Lys Glu Ala Ile Ser Gly
 425 430 435
 Leu Val Cys Leu Val Asn Cys Ala Ile Gly Met Val Phe Thr Met
 440 445 450
 Glu Ala Gly Asn Tyr Trp Phe Asp Ile Phe Asn Asp Tyr Ala Ala
 455 460 465
 Thr Leu Ser Leu Leu Leu Ile Val Leu Val Glu Thr Ile Ala Val
 470 475 480
 Cys Tyr Val Tyr Gly Leu Arg Arg Phe Glu Ser Asp Leu Lys Ala
 485 490 495
 Met Thr Gly Arg Ala Val Ser Trp Tyr Trp Lys Val Met Trp Ala
 500 505 510
 Gly Val Ser Pro Leu Leu Ile Val Ser Leu Phe Val Phe Tyr Leu
 515 520 525
 Ser Asp Tyr Ile Leu Thr Gly Thr Leu Lys Tyr Gln Ala Trp Asp
 530 535 540
 Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Thr Lys Asp Tyr Pro Ala Tyr Ala
 545 550 555
 Leu Ala Val Ile Gly Leu Leu Val Ala Ser Ser Thr Met Cys Ile
 560 565 570
 Pro Leu Ala Ala Leu Gly Thr Phe Val Gln Arg Arg Leu Lys Arg
 575 580 585
 Gly Asp Ala Asp Pro Val Ala
 590

<210> 7
 <211> 2168

WO 01/90148

PCT/US01/16283

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7617689CB1

<400> 7
 ccacgcgtcc gtaaggtggg atggatagca ggggtctcagg cacaaccagt aatggagaga 60
 caaaaccagt gtatccagtc atggaaaaga agggaggaga tggcaccctg gagcgggggc 120
 acgtgaacaa caagatggag tttgtgctgt caatggctgg ggagatcatt ggcttaggca 180
 acgtctggag gtttccctat ctctgtctaca aaaatggggg aggtgccttc ttcattccct 240
 acctcgtctt cctctttacc tggggcattc ctgtctctcc tctggagaca gaactaggcc 300
 agtacactag ccaggggaggc gtacagcctt ggaggagat ctgcctccatc tttgagggca 360
 ttggctatgc ctccagatg atcgtcatcc tcctcaactg ctactacatc attgtgttgg 420
 cctggggcct gttctacctc ttcagcagct tcaccatcga cctgcctctg ggcggtgct 480
 accatgagtg gaacacagaa cactgtatgg agttccagaa gaccaacggc tccctgaatg 540
 gtacctctga gaatgccacc tctctgtca tctggtctg ggagcggcgg gttcttgaaga 600
 tctctgatgg gatccagcac ctggggggcc tgcgtggga gctggctcct tgcctcctgc 660
 tggcctgggt catctgtcac tctgtcactt ggaagggggg gaagtccaca ggaagggctg 720
 tgtactctac ggccacattt ccttacctca tctgtgggtt cctgttaatt cgagggttga 780
 cgttgcctgg ggcagcccaa ggaattcagt tttacctgta cccaacctc acgcgtctgt 840
 gggatcccca ggtgtggatg gatgcaggca ccagatattt cttctccttc gccatctgtc 900
 ttgggtgctg gacagccctg ggcagctaca acaagtacca caacaactgc tacagggaat 960
 gcatcgcctt ctgctctctc aacagcggca ccagctttgt ggccggcttt gccatcttct 1020
 ccatcctggg ctctcatgtt caggagcagg ggggtcccat ttctgaggtg gccaggtcag 1080
 gccctggcct ggtcttcatc gcttaccctg gggctgtggg gatgctgcc tctctctctc 1140
 tctgtggctg ctgtttcttc ttcattgtgt ttctctgggg actggatagc cagtttgtgt 1200
 gtgtagaagc cctggtagaa cgcgtgttgg acatgtaccb tcactgttgc cgaagaaga 1260
 accggaggga agtctctatc ctggagtagt ctgtctcttc cttctctgtg gggctgatca 1320
 ttgggtgctg gggcggaatg taagtgttcc agctctttga ctactatgca gccagtggca 1380
 tgtgcctctt gttcgtggcc atctctgagt cctctgtgtt ggcctgggtt tacggagcca 1440
 agcgtctcta cgacaacatc gaagacatga ttgggtacag gccatggcct cttatcaaat 1500
 actgttggct ctctctcaca ccagctgtgt gcacagccac ctttctcttc tccctgataa 1560
 agtacactcc gctgacctac aacagaagt acacgtaccg gtggtagggc gatgacctgg 1620
 gctgctcctt gctctgtctc tccatgtctt geattctctg ctggagcttc tacagactcg 1680
 gaacctcaaa gggccctctc agagagagaa tccgtcagct catgtgccca gccaggagcc 1740
 tggcccgagc gaacctcaga ggaacctcgg ctcccgccac cccagggacc tcactgtcca 1800
 gactcacaga gctagagctt cactgtcagg gggcagggcc ttggatgggt cctgtgtgcc 1860
 tggccttggg gatggctgtg gagggaacgt ggcagaagca gcccatgtg cttccctgcc 1920
 cccgacctgg agtggataag acaagagggg tattttggag tccacctgct gatctggagg 1980
 cctccacttg caactttcca gctcaggggt tgttgaacag atgtgaagg ccagtgccaa 2040
 gagtgtccct ctgagacctt tgggaagctg ggtgggggtg gttaggtggg gggagacttg 2100
 ctggctctgg gccctctctt ccttcaltec attaaatcca cattcttccc gctgaaaaaa 2160
 aaaaaaaa 2168

<210> 8
 <211> 2709
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 6881669CB1

<400> 8
 catctcgggt ctttacttcc tatcaagtaa cattgttttg aaaaatagag ttaacacatt 60
 tggcataaagg gagttttttt tttttttttt aattactctg aatactctcc aaatgccaa 120
 aaatagcaag gtggtaaaaa gagaaltaga tgatgatgtt actgagtctg tcaagacct 180
 tctttccaat gaagacgcag ctgatgatgc ttttaagaca agtgaactaa ttgtttgatg 240
 ccaggaaagag aaagatacag atgttgaaag aggatctgaa gtggaagatg aaagaccagc 300
 ttggaaacagt aaactacaat acatcctcgg ccaagtctga tttctgtatg gtttaggaaa 360
 tgtgtggcga tttccatacc tatgtcaaga gaatgggggc ggtgcatalc ttttaccata 420
 ttttaactata cttatggtaa taggtattcc ccttttttct ttggaaactc ctgtgggtca 480
 aagaattcgg cyagccagca ttggtgatg gaattacata agccataaac tgggcgggat 540
 tggatttgcg agttgtgtag ttgtctattt tttagctctc taactacaag tcatcttgg 600
 ctggagtttg ttttattttt ctacgtcttt tcagcaaccc ctgccttggg atcagtgtcc 660

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

tttggtgaaa aatgcttcac acacttttgt agaaccagaa tgtgaacaaa gttctgccac 720
cacctattac tggtagacggg aagcactgaa tatttcaagt tccattttctg aaagtggggg 780
cttanaactgg aagatgacca tctgcttgggt ggtgcctggg gtcattgggtt gcttggctat 840
gatcaaaaggc attcagctctt ctgaaaaaat catatatattt agttctctgtt ttccatcatgt 900
gggtacttaitt tggcttctca toagagcatt ccttttaaat ggttcaattg atggcattcg 960
ccacatgtttt acccotaagc ttgaataaat gctggagccc aaggtctggga gagaagctgc 1020
tactcaagtg ttcttggcct taggtctggg atttggctgt gtcatttgcct ttccaageta 1080
caacaagaga gacaacaact gccactttga tgcgtctctg gtgtctctca tcaatttttt 1140
cacttctgtc ctggcaacat tgggtgtgtt tgcagttctg ggcttcaaa gaaatgtcat 1200
aaatgagaaa tgcattacac aaaattcaga gacgatcatg aaatttttga aaatggggaa 1260
cattagtcag gatattatto cccatcatat caacotttca actgttactg cagaagatta 1320
tcatttagtt tatgacatca ttcaaaaagt gaagaagaa gagtttctcg cttctcatct 1380
caattctgtt aaaaattgaag aagagctaaa taaagctgtt caggggaccg gcttagcttt 1440
tattgctttt acagaagcga tgacacattt tctctgaltt ccttctgtgt cagtgaagtt 1500
tttctctatg ctggccaatc taggccttgg cagtatgttt ggaacattg aagggattgt 1560
cacgcttatt gtggacaact tcaagtgag gaaagaaatt cttaactgta tctgtttgtc 1620
tctggcattt tgtattggcc tgatatttgt gcaacgctct ggaattact ttgttacaat 1680
gtttgatgat tattctgcta cactgcctct gctaattgta gtcattttgg agaattatgc 1740
tgtatgcttt gttatggca tagataagtt tatggaagac ctaaaagata tgcctgggtt 1800
tgcctccagc agatattact acatattgtt gaaatattt tctctctaa tgcattatc 1860
attgctaata gctagtgttg tgaatatggg attaatctct cctggctata acgcatggt 1920
tgaagataag gcatctgaag aatttctgag ctatccaaac tggggactgg ttgtttgtgt 1980
ctctctgggt gtctttgcaa tactccagc cctctagttt ttcattgttc gtgccttcaa 2040
ccttatagat gatagtcttg gtaatttagc atctgtgacc tataagagag gaagggctct 2100
gaaagagcct gtgaacttag agggcgatga tacaagcctc attcacggaa aaataccgag 2160
cgagatgcca tctccaaatt ctggtaaaaa tattatoga aaacagagtg gatcccaac 2220
tctggtaact gctcccaatg gacggtatgg aatagggtag ttgatggcag atcattatgc 2280
agatattgca gaactgtatt tggattggg ggaagatgta gtgggtttta ttgtgttct 2340
ttttacaaat gaacattggc cctagtagga gaagcattag gcttcaacta tcagaggcca 2400
atctcaggtg ttccgtggct gtgactttta atctcaacg tatatgtcag ttcaacttga 2460
gcattctttt ggattctttg gtttacattt gtgcagaaag gattgcagac aaactcttag 2520
agggctgagg tacatgtttg ccaggtattt ttttttaaga cctttgggtg attttcaaat 2580
atttctatct cttaaaaaaa tgyttattac tcaattttct ataattttcg gggttagtag 2640
tgttgacaat taaaaatggt atacattaaa atttataagt tgccttcagg gtaacttcca 2700
gtgtcacac 2709

```

<210> 9
<211> 2958
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2742486CB1

```

<400> 9
caggtccaag agattcttct atctcagcct cctgagtagc tgagattaca gtgcttttat 60
tggaccaacg ctgggtgggt ttctgtatga gaaaattggt ttgtaattgg cagcagctat 120
acaaaggtcta tgggtcttga taagttagtt agccatgggc ttgttttttc tcttgaata 180
ctccagtaga taaaacaagc ccatggctaa tccattatct agagcccata gaccttgat 240
agctgctgcc cattcaaaac caattttctc atacagaatt ccaccagcg ttggtcccat 300
aaaagaccca attgaccaca ttgcactaaa aagacctgat acaagtccca atgtacttaa 360
tccctcttca aaccattttt catgtgcaca actgagaatt tccgggaaag ttggaattat 420
ctcatttcca gcagagaggc cacttacaac taatatcagc accagcagcc agagctgact 480
tttaatatgc aagattgcgg ggaccagag tcttggaagg ctttggggag ctccggggcg 540
ggcggatgcg tgcctgcagg gagtctggga tgcaggttc cagctgagca gggccggccc 600
gcagagtgcc agtggcttcc ttggaggtcg agtccaaagg aatggcttga agcggggagc 660
tggggcgccg gagtccacgc accgggagtg gaggcgctgy gtgacttgya gggaccgcgc 720
gcaccaggag gtgatgatcc tgcaggaaat gcaggagaga cccccgggtg gctttcgaga 780
gaacaggttt ttgtactgat atcggcagct tccgtgaact taggttccat gatgtgctat 840
tctatacttg gaccgttttt ccccaaagag gctgaaaaga agggagccag caatacaatt 900
atcggtagta tctttggatg ttttgctttg ttccagttgc tggcatcctt ggtatttgya 960
aacatcttgg tacatattgg agcaaaaatt atgtttgtag caggaaatgtt tgtctcagga 1020
ggagtacaaa tctcttttgg ttgattggac caggttccag atggggcaggt attttatgct 1080
atgtgttttc tagtgagagt aatggatgca gttagcttgg ctgcagcaat gactgcatc 1140
tcttctatcc tggcaaaagg ttttccaaat aacgtggcta cgtatttggg aagctcttgg 1200
acattttctg gactggggct aatactaggt cctcctgtag gtggcttttt gtatcaatcc 1260

```

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```

tcttggtatg aagtgccctt tattgttttg ggtgctctg ttttgcgtat ggtaccactc 1320
aatatgtata ttttaccocaa ttacgagtc gatccaggtg aacactcatt ctggaaactg 1380
atcgctttac ccaaagtttg ccttatagcc ttctcatca actcaactcag ctggtgtttt 1440
ggcttctctg atcctactct gtctctcttt gttttggaga agttcaattt accagctgga 1500
tatgtgggac tagtatctct ggttatggca ctgtctcatg ccactctctc accactattt 1560
tgctctctaa gtgataaag gccactctt aggaatggc tttggtgtt tggcaactta 1620
atcacagccg ggtgtacat gctcttaggg cctgtcccaa tcttgcatat taaagtcaag 1680
ctctgctgct tgggtctgat attagttgta agtgccctct ctgctggaat gagtataatt 1740
ccaactttcc cggaaattct cagttgtgca catgaaatgt ggttggaaga gggattaagt 1800
acattgggac ttgtatcagg tctttttagt gcaatggggt caattggtgc ttttatggga 1860
ccaacgctgg gtggatttct gtatgagaaa attggttttg aatgggcagc agctatacaa 1920
ggcttatggg ctctgataag tggatlagcc atgggcttgt ttatctact ggagtattca 1980
aggggaanaa ggtctaaatc tcaaaacatc ctcaagccag agggagagc aacactctc 2040
tgcttaaatg aaacctagtc cgtatggtcc tggatgtata caaggttgag aatgaatgc 2100
tcttggcctt aaacatcacc gtaggaaagg tttttaaatt ttacgcgca aaactccgtg 2160
gacccctgct cagtgtcttg gaagtgtcaa cgtgtttttg gatgatcctg tattgggctg 2220
tacttactgt gatactgaaa agctgtcctg ctgaagcagc tatatttgaa atattagta 2280
tgaaaggagt aattaaaaac aagcaaaaca aaacagact tagtttttaa atgaccaaac 2340
ttgtccttaa agatgttgtt attaacctga gttagttctt atttccctg tttattttt 2400
atcttaagta cactgattct gtgaatgtac ctttttact aacagggaag gaatatgaat 2460
aatctgatat gctctaaata cataaaggtg cttaaaaaa tgtagaacaa ttactatgaa 2520
atcagttttt aaagatata ctttctcttt gtctcagggt ttttcggctt tgttcaaaag 2580
gaagaattct tgctgtccat acagaaactc tctagcactc cctgaacctta agcttttcta 2640
aaaattctgt ttgtgtgaaa agtacaagaa taacataact tacaacttcc attttgttaa 2700
cctacgttca cttatgatct ggattataaa acattactgt gtataacgtt tttcatttcc 2760
tttaagtctt ctgttttttg gctctaccat ctgttttttt ttgtttttta tctatatctt 2820
ggtagatgta ttctatccct agagcaggtc agctctcttc cctaatgctg aatgcttgtt 2880
tgttagggaa aggggttccct ccaacttctg gtgaatttgt gatgtgaag tgaataaatg 2940
tctatttgtt aaaaaaaaa 2958

```

<210> 10

<211> 2135

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 71556695CB1

<400> 10

```

ggaaaagggg cttggctccc tctggacctc tcacccagcc cctgcaccct ggagcagagc 60
tgcaaggcagt gtgaccttgg gtctgtattt ggcttaaa caagcaaca ggaaaacac 120
cccaaaaacc cagccttaag agcaagcttc acagtgcgct actccccag tcaaggagag 180
cccogattgt tgcaaatctt gcagatgggg ctgctctcgg cctgcctctt ggtgttgaaa 240
acaggcctcc aagtaccocaa gaagcaagg agatggccac caaggagaa ctcagtgctc 300
tgaaagattt ccacaaggac atcctgaagc cctcaccagg gaagagccca ggcaacggcg 360
ctgaggacga ggctgagggg aaacctccgc agaggggagaa gtggtctagc aagatcgact 420
ttgtgctctc tgtggctggc ggcttctgtg gcttgggcaa cgtctggcgc ttccctgacc 480
ctgtctacaa gaatggtgga ggtgcgtttc ttatccgta ttatttttc ctgtttggga 540
ggggcctgac ttgttttttc ttggagatca tcataggcca gtacacctct gaagggggca 600
tcacctgtct ggaaaagatc tgcccttgtt tctctggtat cggctatgac tccgttgtaa 660
ttgtgtccct cctgaatgct tactacatcg tcatcctggt ctgggcacaa tactacctgt 720
tccagtcctt ccagaaggag ctgcctctgg cacactgcaa ccacagctgt aacacacctc 780
actgcatgga ggacaccatg cgcaagaaca agagtgtctg gatcaccatc agctccacca 840
acttcaacct cctgtctatc gatttctggg agcgcaactg gctgagcttg tccctggaaa 900
tcgaccaccc aggcctctctg aaatgggaac tgcctctctg ccttttttta gtctggctag 960
ttgtgttctt ctgcacttgg aaggcgctca ggtccacttg gaagtgctc tacttcaag 1020
caacttttcc attcgcgatg ctctgtgtg ttgtgttctg agggctgag ctgcctgggg 1080
cgggcgcagg catcaagtct tatctgtatc ctgacatcac ccgctctgag gaccccaagg 1140
tgtggattga cgtctggact cagatattct tctcttatgc catctgcctg ggggctatga 1200
cctgcgtggg gagctacaac agtacaagtt ataactcgta cagggaactgt atgctgtctg 1260
gatgctgtaa cagtgtgacc agtttttgtt ctggtctcgc aattttttcc atcctgggct 1320
tcatggcaca agagcaagggt gtggacattg ctgatgtggc tgagtcaagt cctgctctgg 1380
ccttcatgct ctacccaaaa gctgtgacaa tgatgcgctt gcccaacttt tggctccatt 1440
ttttttttat tatgctctct ttgcttgac ttgtagacca gttgttgtaa gttgaagac 1500
agatcacatc ctgtgtgat ctttacocat ccttctcag gaaggttatc cgtcgggaaa 1560
tcttcatcgc cttctgttgtt agcatcagct acctgctggg gctgacgatg gtgacggagg 1620

```

WO 01/90148

PCT/US01/16283

```
gtggcatgta tgtgtttcag cttcttgact actatgcagc tagcgggtga tgccttttgt 1680
gggttgcatc ctttgaatgt tttgttattg cctggatata tggaggatga aacctttatg 1740
atggtattga ggacatgatt ggttatcggc cggggccctg gatgaagtac agctgggctg 1800
tgatcactcc agttctctgt gttggatgtt tcatctctcc gctcgtcaag tacgtacctc 1860
tgacctcaaa caaaacatac gtgtaccaca actgggcaat tgggtgggct tggagactgg 1920
cccttctctc catgctctgc gttcccttgg tcatcgtcat ccgctctgc cagactgagg 1980
ggcctgtctc tgtgagatgc aagtaacctg tgaccocaa ggaacccaac cgtcgggctg 2040
tggagcgaga gggagccaca cttacaact ctcgcaccgt catgaacggc gctctcgtga 2100
aacggacca catcattgtg gagaccatga tgtga 2135
```

<210> 11

<211> 1997

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 7472800CE1

<220>

<221> unsure

<222> 1810

<223> a, t, c, g, or other

<400> 11

```
gagcgggagg ggagccttcg cggaaacgtc tggggccag gactcgcgtg caaagcccag 60
gcccggggcg caaatgtctc aggggaagag ctcaactccc agtgtgcaca 120
tgagtaagag caaatgtctc gttggactca tgtcttccgt ggtggcccg gctaggagag 180
ccaatgcgtt gggcccgaa gagggtggagc tcatcttgt caaggagcag aacggagtgc 240
agctcaccag ctccaccctc accaaccgag ggcagagccc cgtggagccc caggagctgg 300
agacctgggg caagaagatc gactttctcc tgtccgtcat tggctttgct gttggacctg 360
ccaacgtctg ggggttcccc taccgtgctt acaaaaatgg tggcgggtgc ttctcgtctc 420
cctacctgct cttcatgggtc attgctggga tggcactttt ctacatggag ctggccctcg 480
gcccgttcaa cagggaagg ggcgtggtg tctgggaagat ctgcccata ctgaaaggtg 540
tgggcttcaa ggtcactctc ttctcactgt atgtcggctt attctcaaac gtcactatcg 600
cctggggcgt gcactatctc ttctcctctc taccacggga gctccctgg attcactgca 660
acaactcctg gaacagcccc aactgctcgg atgcccactc tggtagctcc agtggagaca 720
gctcgggctt caacgacact ttgggaacca cactcgtcgc cagtaacttt gaacgtggcg 780
tgctgcacct ccaccagagc catggcatcg acgacctggg gcctccggcg tggcagctca 840
cagcctgcct ggtgctggtc atcgtgctgc tctacttcag cctctgggag ggcgtgaaga 900
cctcagggaa ggttgatagg atcacagcca ccattgcata cgtggtctcc actgcccctg 960
tctcgtgggg ggtcaccctc cctggagcca tagagcgcat cagagcata ctgagcgttg 1020
actctaccg gctctcggag gctcgggtt ggattgacg ggcacccag gtgtgcttct 1080
cctcgggctt ggggttcggg gtcctgatcg cctctctcag ctacaacca ttcaccaaca 1140
actgctacag ggaacgatt gtcaccact ccatcaactc cctgacgagc ttctcctcgg 1200
gcttcgtctt cttctccttc ctggggtaca tggcaccaga gcaacagtgt cccatcgggg 1260
acgtggccaa ggaacggtgag cccctcctgc tgcacctggg cctgctcgt gtagcaccag 1320
cgccgagctc tcagcaaac tcagcctggg cgtggtctt ctcatcaty ctgctcacc 1380
tgggtataga cagcgccatg ggtggtatg agtcaagtat acacggctc atcgtatgag 1440
tcacagctct gcacagacac cctgagctct tccgctctt catcgtctg gcgaacttcc 1500
tctcgtctct gttctcgtc accaacggtg gcatctactt cttcactcct ctggaccatt 1560
ttgcagccgg caggttgatg gacactgatg ccactcttc tccctcaggt gttgggcagt 1620
tcagcgacga catccagcag atgacggggc agcggcccaa cctgtactgg cggctgtgct 1680
ggaagctggt cagccctcgc ttctcctggt tctggtcgt ggtcagcatt gtgacctca 1740
gaccccccac ctacggagcc tacatcttcc cgtactgggc caacgctcgt ggtcgggtca 1800
tcgcacacat ctccatggcc atggtgccc tctatcgggc ctacaagttc tgcagcctgc 1860
ctgggtcctt tcyagagaaa ctggctacg ccatcgcaac cyagaaggac cgtgagctg 1920
tggacagagg ggaagtgctc cagttcacgg tgaggtcgag gtccctgctg ggcctctctc 1980
gggggaattc agaataga 1997
```

<210> 12

<211> 2774

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

WO 01/90148

PCT/US01/16283

<223> Incyte ID No: 7475553CB1

<220>

<221> unsure

<222> 2665

<223> a, t, c, g, or other

<400> 12

```

cgagccggag cggagcgcgc cgagccggg gccatggaga aagcgcggc gctgtgggccc 60
aactcgctac agttcgtgtt cgcctgcac tcgtacgccc tgggcoctggg caacgtgtgg 120
cgattcccggt acctgtgcca gatgtacggc ggaggtagtt tccgtgtccc ctacatcac 180
atgcttatcg tggagggaaat gccctctctg taacctggaa tggctgtggg gcagcgcacg 240
cggcagggca gcacggggc cggagggacc atcagccggt acctcagtg tgcgggggac 300
gcccaggggg tggctctctt ctccctctcc atgtactaca acgtcactaa cgcctggggc 360
ttctgttacc tcttccactc ttccaggat cccctgcgtt ggtctgtctg cccactgaa 420
ggtaaacaca cgggctacga tggagagtg gagagggct cctccacaca gtactctgg 480
tacaggaaaa cctcaatat ctgcgcgtcc ctccaggaga acgggggtgt gcagtgggag 540
ccggcgctgt gccctctctt ggcctggctg gtggtgtacc tgtcaatcct gcgtggcacc 600
gagtcactgt gcaagggtgt gtatttcacg gcgtcactgc cctattgctt gctcactac 660
taactcacta ggggctctac gctccacgga gccacaaatg gctcactgta catgttcaat 720
cccagatag agcagctgg caaccccaag gcctggatca atgcagccac ccagatcttc 780
ttctcacttg gctggggtt cggcagcctg atgcctctcg ccagctacaa tgagccatcc 840
aacaaactgc agaagcagc catcatctg tccctcatca acagcttcac ctccatattt 900
gccagcattg tcaactctc catctatgg ttcaaggcca ccttcaatta tgaaaactgc 960
ttgaagaagg tgagtctgt gctgaccaac acttttgacc ttgaagatgg ctttttgaca 1020
gccagcaacc tggagcaggt gaagggtcac ctgcactctg cctacccaag caaatcacg 1080
gagatgttcc gcacaaatcaa aaactgcagc ttggaatcgg agctagacac ggcctgccag 1140
ggcactggcc tggcattcat cgtctacaca gaggccatba aaaactgga ggtgtccag 1200
ctgtgggtgg tgcctactct ctctactg ctgatgctgg ccattgggag catgctggg 1260
aacacagcgg ccatctctac cctctgaca gacagcaaga tcatctccag ccactgcgc 1320
aaggaggcca tctcaggtct ggtgtgctt gtcaactgtg ccattggcat ggtgttca 1380
atggaggctg ggaactactg gtttgacata ttcaacgact acgcccac actgtccctg 1440
ctgctcatcg tgcgtgtgga gacgattgco gtgtgctacg tgaagggtct gaggagattt 1500
gaaagtgaac ttaaggccat gaccggcga gctgtgagct ggtactgga ggtgatgtg 1560
gctggcgtaa gccactgct gattgtcagc ctctctgtct tctactgag cgaactacac 1620
ctcacgggga cccgtgaatg tcaagcctgg gacgcctccc agggccagct cgtgacaaa 1680
gattacccgg cctatgcaat ggcctgcatc gggctgcttg tggcctctcc caccatgtg 1740
atcccccttg cggccctggg gaattttgtt cagcgtcgcc tcaagagggg agacgcagac 1800
cccgctgect gagatgtgg ctccacgco gctcaggtt ttacagatac tatttacag 1860
cggaactccc tgggtgctt ttccaaatgc ttaagccagg agtgcacg ccatacaact 1920
cctgagtgct taaagaagat gagggaagtg tgcaggaga aaactccctt gggagaacgc 1980
acacccctcc gtgggtgctg ttctctctg tcaactgctt cctcactatg gaaggggtg 2040
ggctatgaaa gccgtgtca aagataactg catctctcat tccaggaag cctgaactt 2100
agggcactat gcaaaactga atatgactat aattcttatg ggaacaaatt taagcaattt 2160
ttgtttttgg ctgaagagac accaaatat tagaggacaa atatttttag atccatttaa 2220
ggagttttga agtgccatag atgacctatt tgtcagtggt gcaaaattaa ttctctctt 2280
ttttgagttg tagtgaatat gcaattctg tgttccctt ccaccttta aatcttagga 2340
tgacactgca taaagaaga agatctttgt ctgggacccc caaaggatc ctttctctaa 2400
ggtctctgac agtgggtcca ggaccagacc tctctacaaa aaattgcccc aactacagtt 2460
tgcaaaccca aaccacatta gaagctgtg cagacatccc tccgtgtgt gttgtctgt 2520
gcatgtgaaa aggaagtcag agccactgt aggtgagaat gaaagtggat ctcagctgg 2580
cacgtgtgct cagcctgta atcctagcac cttgggggtc aaggtgggtg gatcacttga 2640
ggtcaggagt ttgaaggcag cctggmcaaa atggcgaaaa cccatttcta ctaaaatcc 2700
aacaatttag ctggcattgg gggagggttg gaggaaatga attaaagtta tggaaagggt 2760
gaccagggg gggg 2774

```

【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)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/090148 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/00 95054 (US), ELLIOTT, Vicki, S. [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US), PATTERSON, Chandra [US/US]; 490 Sherwood Way #1, Menlo Park, CA 94025 (US), RANKUMAR, Jaya [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA 94555 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/16283
- (22) International Filing Date: 17 May 2001 (17.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/205,518 19 May 2000 (19.05.2000) US
60/213,956 22 June 2000 (22.06.2000) US
60/215,105 28 June 2000 (28.06.2000) US
60/218,947 14 July 2000 (14.07.2000) US
60/221,488 27 July 2000 (27.07.2000) 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): SANJANWALA, Madhu, S. [US/US]; 210 Sylvia Court, Los Altos, CA 94024 (US), WALIA, Narinder, K. [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US), TRIBOULEY, Catherine, M. [FR/US]; 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US), YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US), GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue #1, Menlo Park, CA 94025 (US), DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street #146, Palo Alto, CA 94306 (US), YAO, Monique, G. [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US), LAL, Preeti [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US), BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US), HAFALIA, April [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA
- (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, FR, GB, GR, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- (48) Date of publication of this corrected version: 4 July 2002
- (15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 27/2002 of 4 July 2002, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention provides human neurotransmitter transporter (NTT) and polynucleotides which identify and encode NTT. 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 NTT.

WO 01/090148 A2

【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
29 November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/090148 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12N 15/12, C07K 16/18, C12Q 1/68, G01N 33/53,
33/68, A61K 38/17April [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA
95054 (US). **ELLIOTT, Vicki, S.** [US/US]; 3770 Pollon
Place Way, San Jose, CA 95121 (US). **PATTERSON,**
Chandra [US/US]; 490 Sherwood Way #1, Menlo Park,
CA 94025 (US). **RANKUMAR, Jaya** [IN/US]; 34359
Maybird Circle, Fremont, CA 94555 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/16283

(22) International Filing Date: 17 May 2001 (17.05.2001)

(25) Filing Language: English

(74) Agents: HAMLET-COX, Diana et al.; Incyte Genomics,
Inc., 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(26) Publication Language: English

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, 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.(30) Priority Data:
60/205,518 19 May 2000 (19.05.2000) US
60/213,956 22 June 2000 (22.06.2000) US
60/215,105 28 June 2000 (28.06.2000) US
60/218,947 14 July 2000 (14.07.2000) US
60/221,488 27 July 2000 (27.07.2000) US(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 (BJ, BF, CI,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(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): **SANJANWALA,**
Madhu, S. [US/US]; 210 Sylvia Court, Los Altos, CA
94024 (US). **WALLA, Narinder, K.** [US/US]; 890 Davis
Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). **TRIBOULEY,**
Catherine, M. [FR/US]; 1121 Tennessee Street #5, San
Francisco, CA 94107 (US). **YUE, Henry** [US/US]; 826
Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US). **GANDHI,**
Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue #1, Menlo Park,
CA 94025 (US). **DING, Li** [CN/US]; 3353 Alma Street
#146, Palo Alto, CA 94306 (US). **YAO, Monique, G.**
[US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043
(US). **LAL, Preeti** [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara,
CA 95056 (US). **BAUGHN, Mariah, R.** [US/US]; 14244
Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). **HAFALIA,**

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
14 August 2003

(15) Information about Correction:

Previous Correction:

see PCT Gazette No. 27/2002 of 4 July 2002, Section II

For 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 01/090148 A3

(54) Title: NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS

(57) Abstract: The invention provides human neurotransmitter transporter (NTT) and polynucleotides which identify and encode NTT. 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 NTT.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/16283
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N15/12 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68 A61K38/17		
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 C07K G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, WPI Data, PAJ, EMBL, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 18143 A (SYNAPTIC PHARMA CORP) 16 September 1993 (1993-09-16) page 18, line 3 - line 12; claims 1-159; figure 1A	1-45,51
X	BORDEN L A ET AL: "MOLECULAR HETEROGENEITY OF THE GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA) TRANSPORT SYSTEM" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 267, no. 29, 15 October 1992 (1992-10-15), pages 21098-21104, XP002916398 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-5,9, 11,12

	-/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 November 2002		Date of mailing of the international search report 29. 01. 2003
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: 91 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kools, P

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/16283
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RASOLA A ET AL: "MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF A GABA/BETAINE TRANSPORTER FROM HUMAN KIDNEY" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 373, 1995, pages 229-233, XP002932543 ISSN: 0014-5793 the whole document	1-45,51
A	SCHULDINER S ET AL: "VESICULAR NEUROTRANSMITTER TRANSPORTERS: FROM BACTERIA TO HUMANS" PHYSIOLOGICAL REVIEWS, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, US, vol. 75, no. 2, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 369-392, XP000199557 ISSN: 0031-9333 the whole document	1-45,51
A	BARNWELL L F S ET AL: "Cloning and sequencing of a cDNA encoding a novel member of the human brain GABA/noradrenaline neurotransmitter transporter family" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 159, no. 2, 4 July 1995 (1995-07-04), pages 287-288, XP004042226 ISSN: 0378-1119 the whole document	1-45,51
P,X	WO 00 77045 A (KIMURA HIROYUKI ; SAWADA HIDEKAZU (JP); SAKAMOTO JUNICHI (JP); TAKE) 21 December 2000 (2000-12-21) Sequence listing, Seq ID No 1 and 2	1-45,51
E	WO 01 77321 A (MERCK PATENT GMBH ; BRANDT SILKE (DE)) 18 October 2001 (2001-10-18) claims 1-11; figure 1	1-45,51

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/16283
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2. ☒ Claims Nos.: 20 and 23 partially because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-44 (partially); 45, 51 (complete)	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/US 01/16283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim(s) 32 and 34 are interpreted as 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 compound.

Although claims 18, 21, 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20 and 23 partially

Present claims 20, and 23, relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the polypeptide and antibodies of the invention.

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 01/16283

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 partially, and claims 45 and 51, completely

Isolated peptide (Seq ID No 1), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 1, the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 7 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

2. Claims: 1-44, all partially, and claims 46 and 52, completely

Isolated peptide (Seq ID No 2), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 2,

International Application No. PCT/US 01/16283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 8 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

3. Claims: 1-44, all partially, and claims 47 and 53, completely

Isolated peptide (Seq ID No 3), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 3, the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 9 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

4. Claims: 1-44, all partially, and claims 48 and 54, completely

Isolated peptide (Seq ID No 4), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for

International Application No. PCT/US 01/16283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 4, the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 10 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

5. Claims: 1-44, all partially, and claims 49 and 55, completely

Isolated peptide (Seq ID No 5), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 5, the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 11 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

6. Claims: 1-44, all partially, and Claims 50 and 56, completely

International Application No. PCT/US 01/16283

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Isolated peptide (Seq ID No 6), or a naturally occurring polypeptide comprising a sequence of at least 90% identity, biological active fragments, and immunogenic fragments thereof. A method for producing said polypeptides. Specific binding poly- and monoclonal antibodies to said polypeptide and methods of generating said antibodies. Pharmaceutical composition comprising said polypeptide. Methods for treating diseases, and methods for screening for agonists, antagonists and modulating compounds. Agonists and antagonists isolated by said methods. Diagnostic test and methods of diagnosis using specific antibodies. Compositions comprising said antibodies. Methods of detecting and purifying the polypeptide of the invention using said antibodies.

Polynucleotides encoding the polypeptide with Seq ID No 6, the biological active fragments, and immunogenic fragments. The polynucleotide with Seq ID No 12 and those with at least 90% identity, and fragments of said polynucleotides comprising at least 60 nucleotides. Recombinant polynucleotides comprising said polynucleotides. A cell transformed with said polynucleotide. A transgenic organism comprising said polynucleotide. Method of detecting said polynucleotides. Method for screening a compound, or assessing the toxicity of a compound using said polynucleotide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/16283

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9318143 A	16-09-1993	AU 691469 B2	21-05-1998
		AU 3789393 A	05-10-1993
		AU 707934 B2	22-07-1999
		AU 8090698 A	15-10-1998
		CA 2131444 A1	16-09-1993
		EP 0631623 A1	04-01-1995
		JP 7507446 T	24-08-1995
		WO 9318143 A1	16-09-1993
		US 5658786 A	19-08-1997
		US 6225115 B1	01-05-2001
WO 0077045 A	21-12-2000	AU 5245900 A	02-01-2001
		EP 1186615 A1	13-03-2002
		WO 0077045 A1	21-12-2000
		JP 2001054393 A	27-02-2001
WO 0177321 A	18-10-2001	WO 0177321 A2	18-10-2001
		EP 1276868 A2	22-01-2003

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 5/00	A 6 1 P 7/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 9/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/06	
A 6 1 P 9/06	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/24	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 25/30	A 6 1 P 27/12	
A 6 1 P 27/12	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/28	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 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	C 1 2 Q 1/68	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
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	

(31)優先権主張番号 60/218,947

(32)優先日 平成12年7月14日(2000.7.14)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/228,448

(32)優先日 平成12年7月27日(2000.7.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,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 ワライヤ、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 7 7 ・サンレアンドロ・# 2 0 5 ・デービスストリート 8 9 0
- (72)発明者 トリボレー、キャサリーン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 0 7 ・サンフランシスコ・# 5 ・テネシーストリート 1 1 2 1
- (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 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 ディング、リー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 3 0 6 ・パロアルト・# 1 4 6 ・アルマストリート 3 3 5 3
- (72)発明者 ヤオ、モニーク・ジー
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・フレデリックコート 1 1 1
- (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 9 5 0 5 6 ・サンタクララ・ピーオーボックス 5 1 4 2
- (72)発明者 ボーゲン、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 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 エリオット、ピッキ・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 5 1 2 1 ・サンノゼ・ポルトンブレイスウェイ 3 7 7 0
- (72)発明者 パターソン、チャンドラ
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 ・シャーウッドウェイ 4 9 0
- (72)発明者 ランクマール、ジャヤ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 5 5 ・フレモント・メイバードサークル 3 4 3 5 9

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36
DA37 DA77 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA09 CA11 DA02 EA02 HA14 HA17
4B063 QA01 QA06 QA13 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36
QR48 QR55 QR62 QR77 QR84 QS16 QS25 QS34 QX01 QX02
QX07
4B064 AG20 AG27 BH09 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA16 BA01 BA08 BA21 BA22 DC50 MA52 MA55 MA56
MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA022 ZA032 ZA062 ZA122
ZA152 ZA162 ZA182 ZA202 ZA362 ZA422 ZA812 ZA942 ZB262 ZB322
ZB332 ZB352 ZC352 ZC412
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA45 DA50 DA75 EA20 EA50
FA74 GA26

专利名称(译)	神经递质转运蛋白		
公开(公告)号	JP2004514411A	公开(公告)日	2004-05-20
申请号	JP2001586959	申请日	2001-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	洞察Genomics公司		
申请(专利权)人(译)	洞察基因组公司		
[标]发明人	サンジャンワラマデューエス ワライヤナリンダーケイ トリボレーキャサリーンエム ユエヘンリー ガンディーアミーナアール ディングリー ヤオモニークジー ラルプリーティ ボーグンマライアアール ハファリアエープリル エリオットビッキエス パターソンチャンドラ ランクマールジャヤ		
发明人	サンジャンワラ、マデュー・エス ワライヤ、ナリンダー・ケイ トリボレー、キャサリーン・エム ユエ、ヘンリー ガンディー、アミーナ・アール ディング、リー ヤオ、モニーク・ジー ラル、プリーティ ボーグン、マライア・アール ハファリア、エープリル エリオット、ビッキ・エス パターソン、チャンドラ ランクマール、ジャヤ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/12 A61P13/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/ /16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P27/12 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/ /566		
CPC分类号	A61K38/00 A61P13/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/ /16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P27/12 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P3/08 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/ /12 A61P13/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P27/12 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/ /00 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z 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/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/BH09 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA16 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/DC50 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA032 4C084/ZA062 4C084/ZA122 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA182 4C084/ZA202 4C084/ZA362 4C084/ZA422 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26

優先権 60/205518 2000-05-19 US
60/213956 2000-06-22 US
60/215105 2000-06-28 US
60/218947 2000-07-14 US
60/228448 2000-07-27 US

外部リンク [Espacenet](#)

摘要(译)

本発明提供人神経递质转运蛋白 (NTT) 和鉴定和编码NTT的多核苷酸。 本発明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。 本発明还提供了用于诊断，治疗或预防与NTT异常表达有关的疾病的方法。

(P2004-514411A) (43) 公表日 平成16年5月20日 (2004.5.20)			
(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 45/00		4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 3/08		4 B 0 6 3
A 6 1 P 3/08	A 6 1 P 3/10		4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/00		4 B 0 6 5
審査請求 未請求		予備審査請求 有 (全 228 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2001-586859 (P2001-586859)	(71) 出願人	301005060
(86) (22) 出願日	平成13年5月17日 (2001.5.17)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月15日 (2002.11.15)		イテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/016283		アメリカ合衆国カリフォルニア州9430
(87) 国際公開番号	W02001/090148		4・パロアルト・ボートードライブ 31
(87) 国際公開日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		60
(31) 優先権主張番号	60/205,518	(74) 代理人	100089266
(32) 優先日	平成12年5月19日 (2000.5.19)		弁理士 大島 剛一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	サンジャンワラ、マデュー・エス
(31) 優先権主張番号	60/213,956		アメリカ合衆国カリフォルニア州9402
(32) 優先日	平成12年6月22日 (2000.6.22)		4・ロスアルトス・シルビアコート 21
(33) 優先権主張国	米国 (US)		0
(31) 優先権主張番号	60/215,105		
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		