

(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2004-528009

(P2004-528009A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 186 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-532625 (P2002-532625)	(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10月1日 (2001.10.1)	(74) 代理人	100089266 弁理士 大島 陽一
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月31日 (2003.3.31)	(72) 発明者	タング、ワイ・トム アメリカ合衆国カリフォルニア州95118・サンノゼ・ランウィックコート 4230
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/030591		
(87) 国際公開番号	W02002/029055		
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		
(31) 優先権主張番号	60/237,456		
(32) 優先日	平成12年10月2日 (2000.10.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖結合タンパク質

(57) 【要約】

本発明はヒトの糖結合タンパク質 (C A R B A P)、および C A R B A P 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、C A R B A P の異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

(a) SEQ ID NO: 1 - 2 (配列番号 1 乃至 2) を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片

(d) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片 10

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有する、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: 3 - 4 (配列番号 3 乃至 4) を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有する、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連結したプロモーター配列を含む組換えポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、 30

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

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とから成る。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異結合するような単離された抗体。

【請求項 12】

以下の (a) 乃至 (d) を有する群から選択した単離されたポリヌクレオチド。 40

(a) SEQ ID NO: 3 - 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(b) SEQ ID NO: 3 - 4 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(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 13】

請求項 12 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 50

離されたポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 12 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) 前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を有する少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて、そのプローブと前記標的ポリヌクレオチド、またはその断片との間でハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で前記サンプルをハイブリダイズする過程と、

(b) 前記ハイブリダイゼーション複合体の存在・不存在を検出し、前記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方法を含む。

10

【請求項 15】

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 14 に記載の方法。

【請求項 16】

請求項 12 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。

20

【請求項 17】

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

【請求項 18】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項 17 に記載の成分。

【請求項 19】

機能的な CARBAP 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 17 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。

30

【請求項 20】

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

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

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

【請求項 21】

請求項 20 に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする成分。

40

【請求項 22】

機能的な CARBAP 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 21 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 23】

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

(a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝すステップと、

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

50

【請求項 24】

請求項 23 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ことを特徴とする成分。

【請求項 25】

機能的な CARBAP 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、そのような治療が必要な患者に請求項 24 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 26】

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、

10

(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 つの試験化合物に混合させる過程と、

(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過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 27】

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、

20

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

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

【請求項 28】

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、

30

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

(b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、

(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 29】

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 12 のポリヌクレオチドの少なくとも 20 の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 12 のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、

40

(c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、

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

【請求項 30】

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

50

(a) 前記抗体を前記ポリペプチドと混合し、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 1 に記載の抗体と混合する過程と、

(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 1】

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 1 に記載の抗体。

10

【請求項 3 2】

請求項 1 1 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 3】

被検者の C A R B A P 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 2 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 4】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の化合物。

【請求項 3 5】

被検者の C A R B A P 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 4 に記載の化合物の有効量を前記被検者に投与する過程を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 3 6】

請求項 1 1 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 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫原性断片を用いて動物を免疫化する過程と

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の方法で産出したポリクローナル抗体。

【請求項 3 8】

請求項 3 7 に記載のポリクローナル抗体及び適切なキャリアを含む組成物。

【請求項 3 9】

請求項 1 1 に記載の抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を作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 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列含むポリペプチドまたはその免疫原性断片を用いて動物を免疫化する過程と

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

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

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクローナル抗体から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 4 1】

50

請求項 40 に記載のモノクローナル抗体及び適切なキャリアを含む組成物。

【請求項 42】

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 11 に記載の抗体。

【請求項 43】

組換え免疫グロブリンライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 44】

S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、

10

(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 11 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、S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを示唆することを特徴とする方法。

【請求項 45】

S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

20

(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 11 に記載の抗体をインキュベートする過程と、

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、S E Q I D N O : 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 46】

マイクロアレイの少なくとも 1 つが請求項 13 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするマイクロアレイ。

【請求項 47】

ポリヌクレオチドを含むサンプルの転写イメージを作製する方法であって、

30

a) サンプルのポリヌクレオチドを標識する過程と、

b) ハイブリダイゼーション複合体形成に適した条件下で請求項 46 に記載のマイクロアレイのエレメントをサンプルの標識されたポリヌクレオチドと接触させる過程と、

c) サンプルのポリヌクレオチドの発現を定量化する過程を含むことを特徴とする方法。

【請求項 48】

固体基板上の固有の物理的位置に付着された種々のヌクレオチド分子を含むアレイであって、少なくとも 1 つの前記ヌクレオチド分子が、標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチドと特異的にハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを有し、前記の標的ポリヌクレオチドが請求項 12 に記載のポリヌクレオチドであることを特徴とするアレイ。

40

【請求項 49】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドの少なくとも 30 の連続したヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 50】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的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に完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

【請求項 51】

請求項 48 に記載のアレイで、前記の最初のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列が前記の標的ポリヌクレオチドに完全に相補的であることを特徴とするアレイ。

50

【請求項 5 2】

請求項 4 8 に記載のアレイで、マイクロアレイであることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 3】

請求項 4 8 に記載のアレイで、前記のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの最初の配列を有するヌクレオチド分子にハイブリダイズした前記の標的ポリヌクレオチドを有することを特徴とするアレイ。

【請求項 5 4】

請求項 4 8 に記載のアレイで、リンカーが少なくとも 1 つの前記のヌクレオチド分子と前記の固体基板を連結していることを特徴とするアレイ。

【請求項 5 5】

請求項 4 8 に記載のアレイで、基板上の固有の物理的位置の各々が複数のヌクレオチド分子を含み、任意の単一の固有の物理的位置でのその複数のヌクレオチド分子は同一の配列を有し、基板上の固有の物理的位置の各々は、基板上の別の固有の物理的位置でのヌクレオチド分子の配列とは異なる配列を有するヌクレオチド分子を含むことを特徴とするアレイ。

10

【請求項 5 6】

SEQ ID NO : 1 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 7】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸配列を有する請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5 8】

SEQ ID NO : 3 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項 5 9】

SEQ ID NO : 4 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、糖結合タンパク質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細胞増殖異常、自己免疫/炎症性の疾患、生殖系疾患、および神経系疾患の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、糖関連タンパク質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。

30

【0002】

(発明の背景)

タンパク質はいくつかの方法で糖質に会合している。糖タンパクは共有結合で付着した糖質を有しており、これらの炭水化物はこれらのタンパク質が分泌経路を通過する時に付加されたものである。糖質を結合、修飾、または分解する目的で、いくつかのタンパク質は糖質を含む高分子と非共有結合的に会合する。糖タンパク、糖脂質、グリコサミノグリカン、およびプロテオグリカンなどの糖を含む高分子は細胞表面や細胞外マトリックスに見つけられる。グリコサミノグリカン(GAG)は、二糖ユニットの反復から構成される直鎖状の分岐のない多糖である。GAGは遊離して存在するか、またはプロテオグリカンの一部として存在し、プロテオグリカンは1つ以上のGAGが付いたコアタンパク質から成る巨大な分子である(Lodish, H. 他(1995) Molecular Cell Biology Scientific American Books New York NY, 871, 11361142 ページを参照)。

40

【0003】

糖タンパク、糖脂質、および膜貫通プロテオグリカンなどの細胞表面の糖含有高分子は他の細胞との接着および細胞外マトリックスの成分との接着を仲介する。細胞外マトリックスは、細胞から分泌された、多様な糖タンパク、GAG、および糖含有タンパクから構成され、細胞表面と密接した組織的な網状に構築されている。周囲のマトリックスと細胞と

50

の相互作用は細胞の形、強度、柔軟性、運動性、および接着に影響する。これらの動的な性質は、細胞増殖、細胞分化、組織の構成、および胚発生を制御するシグナル伝達経路と密接に関連している。

【0004】

GAGヒアルロン酸(HA)は、特に柔らかい結合組織で多数の細胞の細胞外マトリックスに見られ、滑液に豊富である(Pittsillides, A. A. 他(1993) Int. J. Exp. Pathol. 74:27-34)。HAは細胞の制御、発生、および分化で重要な役割を果たしていると思われる(Laurent, T. C. および J. R. Fraser (1992) FASEB J. 6:2397-2404)。HAは水と細胞質タンパク質のホメオスタシスで機能する(前記のLaurent)。HAの産出量が増殖中の細胞で増加していることから、有糸分裂で役割を果たしている可能性がある。HAは腫瘍細胞の接着と遊走を誘導することが知られており、HAの小断片は脈管形成を起こす。HAは、薬剤放出制御用マトリックス、神経ガイド、および傷用包帯などの医学用応用の生物材料として化学的に修飾されている。HAの組織保護特性と流動学的特性は眼の手術に有用であることが立証されている。血清中のHAは肝臓病や慢性関節リウマチのような種々の炎症状態の診断となる。HAの蓄積によって起こる間質性浮腫は、種々の器官で機能障害を起こす(前記のLaurent)。

10

【0005】

ヒアルロニダーゼは、HAのN-アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸残基の間の1,4連結を無作為の加水分解を触媒してHAをオリゴ糖に分解する酵素である。ヒアルロニダーゼは、細菌、昆虫、爬虫類、および哺乳類等の広範囲な生物で見つけられており、細胞接着、感染、脈管形成、およびシグナル伝達で機能している可能性がある。

20

【0006】

哺乳類の精巣で発現されるタンパク質でマウスとヒトの精子の原形質膜に存在するPH-20は、ヒアルロニダーゼ活性を持っている(Lin, Y. 他(1994) J. Cell Biol. 125:1157-1163)。PH-20によって、精子は哺乳類の卵子の外層を貫通できる。卵子の外層は、HAが多く含まれた細胞外マトリクスに埋め込まれた約3000の卵丘細胞から構成されている。この層を貫通することが、受精過程で重要なステップである。PH-20はまたいくつかの腫瘍細胞でも発現されている。精巣以外の哺乳類ヒアルロニダーゼも存在する。HYAL1ヒアルロニダーゼはヒトの血清で発現されているのに対し、リソソームのヒアルロニダーゼ、HYAL2は多くの細胞で発現されている(Lepperdinger, G. 他(1998) J. Biol. Chem. 273:22466-22470)。HYAL2は、一酸化窒素合成酵素のようなシグナル伝達経路に関与する酵素の発現、および脈管形成を誘導する特異なHA断片を産生する役割をもっている可能性がある。リソソームタイプのヒアルロニダーゼは、サイトカインで制御される過程で肺の線維芽細胞でHAを分解し得る(Sampson, P. M. 他(1992) J. Clin. Invest. 90:1492-1503)。

30

【0007】

種々のヘビ、ハチ、スズメバチ、オニダルマオコゼ、カモノハシ、サソリ、およびトカゲなどの多くの動物の毒にはヒアルロニダーゼが含まれている。クロスズメバチからのヒアルロニダーゼは、敏感な人々にIgE反応を引き起こすアレルゲンである(Lu, G. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:4457-4465)。毒のヒアルロニダーゼは、毒の拡散を助ける「拡散因子」として作用すると考えられる。出血性毒が注入されたマウスで、トカゲ毒のヒアルロニダーゼが出血領域の拡大を促進することを研究者達が見つけている(Tu, A. T. および R. R. Herndon (1983) Comp. Biochem. Physiol. B 76:377-383)。ウエルシュ菌(Clostridium perfringens)のヒアルロニダーゼは、食中毒とガス壊疽を起こすこの細菌の病原性に重要である(Canard, B. 他(1994) Mol. Gen. Genet. 243:215-224)。ヒアルロ

40

50

ニダーゼは宿主の結合組織を壊し、ウエルシュ菌が最初の感染部位から広がり、周囲組織にコロニーを作り攻撃できることを可能にする。

【0008】

ヒアルロニダーゼは、生殖、癌、および炎症に関係する。PH-20で免疫されたオスとメスのモルモットで効果的な避妊(100%)が得られた(Primakoff, P. 他(1988) Nature 335:543-546)。これらの結果に基づいて、研究者達はヒトに好適な抗精子PH-20の避妊ワクチンを作製する努力を続けている(Zhu, X. および R. K. Nak (1994) Arch. Androl. 33:141-144)。前立腺腫瘍組織でのヒアルロニダーゼ活性は、正常な前立腺と良性の前立腺過形成での活性と比べて有意に高くなっている(Lokeshwar, V. B. ? (1996) Cancer Res. 56:651-657)。更に、組織内のヒアルロニダーゼのレベルは腫瘍の進行と良い相関性がある。ヒアルロニダーゼ、ビンデシン、シスプラチン、および放射線を組み合わせた治療法は、進行した頭と首の扁平細胞癌に対して非常に効果があり、ほとんどの患者が忍容できる(Klocker, J. 他(1995) Am. J. Clin. Oncol. 18:425-428)。化学療法薬であるビンブラスチンと共に投与されたヒアルロニダーゼは、ヌードマウスに移植されたSK-Mel-3黒色腫に有意な抗腫瘍効果があった(Spruss, T. 他(1995) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121:193-202)。更に、ヒアルロニダーゼは実験動物で良く忍容され、ビンブラスチンの皮下注射後、通常見られる局所的炎症反応を妨げた。

10

20

【0009】

レクチンは細胞外糖タンパク質の普遍的なファミリーを構成し、特異的にかつ可逆的に細胞表面の糖に結合し、細胞の凝集を起こす(Drickamer, K. および M. E. Taylor (1993) Annu. Rev. Cell Biol. 9:237-264の概説を参照)。この機能は、免疫反応の活性化に特に重要である。レクチンは炎症部位でリンパ球の凝集と細胞分裂促進の刺激を仲介する(Lasky, L. A. (1991) J. Cell. Biochem. 45:139-146; Paietta, E. 他(1989) J. Immunol. 143:2850-2857)。

【0010】

レクチンは、糖結合特異性に基づいてサブファミリーに更に分類される。ガレクチンサブファミリーは、特にチオール依存性の方法でガラクトシド糖部分に結合するレクチンを含む(Hadari, Y. R. 他(1995) J. Biol. Chem. 270:3447-3453)。ガレクチンは広範囲に発現され、発生的に制御されている。すべてのガレクチンはN末端のシグナルペプチドを欠いているため、ガレクチンは通常でない分泌機構によって細胞外に出されていると示唆されている。2つのクラスのガレクチンが、分子量とオリゴマー形成の特徴に基づいて定義されている。小さいガレクチンはホモ二量体を形成し、分子量は約14~16キロダルトンである。一方、大きいガレクチンは単量体で29~37キロダルトンの分子量をもつ。ガレクチンは、ガラプチン(galaptin)ドメインとしても知られる、特徴的な糖認識ドメイン(CRD)を含む。CRDは約140アミノ酸の長さを持ち、いくつかの保存残基を含む。2次構造の予測は、CRDはいくつかのシートを形成することを示している。概知のガレクチンは1つか2つのCRDを含む(Prositate P D O C 0 0 2 7 9 Vertebrate galactoside-binding lectin signatureを参照)。

30

40

【0011】

ガレクチンは、細胞-細胞および細胞-マトリックスの間の相互作用に関連する疾患や健康状態で多くの役割を果たす。例えば、ある種のガレクチンは炎症部位に関連し、細胞表面の免疫グロブリンE分子に結合する。更に、ガレクチンが癌転移で重要な役割を果たしている可能性がある。ガレクチンの過剰発現は、ヒトとマウスでの転移潜在性と相関がある。さらに、抗ガレクチン抗体は、細胞凝集や足場依存性成長などの、細胞形質転換に関連する過程を阻害する。

50

【0012】

前立腺癌腫瘍抗体1 (PCTA-1)としても知られるガレクチン-8は、癌の進行に関与すると考えられる新規なガレクチンである (Su, Z. - Z. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252-7257)。ガレクチン-8は、前立腺腫瘍に対するモノクローナル抗体であるPro 1.5によって認識される細胞表面抗原として、最初に同定された。ガレクチン-8の遺伝子は317のアミノ酸をコードし、2つのCRDを含む。ガレクチン-8は浸襲性の前立腺癌と初期段階の前立腺癌で発現されるが、正常な前立腺細胞または良性の前立腺肥大細胞では発現されない。更に、ガレクチン-8は培養された前立腺癌細胞の表面から切り取られ、培養液に放出される。これらの結果を合わせると、ガレクチン-8の検出が前立腺癌の初期診断に有用であり得ることと、循環中のガレクチン-8のレベルが病気の疾患と関連し得ることを示唆している。更に、マウスでの予備的な研究はモノクローナル抗体Pro 1.5がそれ自身、腫瘍進行に対する効果的な治療薬となり得ることを示唆している。

10

【0013】

ムチンは、非常にグリコシル化された糖タンパクで、粘液ゲルの主要な構成成分である。ムチンの生理学的機能は、細胞保護、機械的保護、分泌液の粘性維持、および細胞認識である。ムチンには、分泌型と膜結合型の2つの型がある。分泌型ムチンのいくつかは、そのポリマーの本質からゲル形成性がある。胃腸管の主要なムチンはMUC2と呼ばれ、腸の杯細胞によって産生される。このムチンは他のムチンとは異なった性質をもち、不溶性の粘液ゲルを形成することができる。MUC6はヒトの胃ムチンであり、胆嚢、膵臓、精液小胞、および女性の生殖管にも見つけられる (Toribara, N.W. 他 (1997) J. Biol. Chem. 272:16398-16403)。MUC6遺伝子は、ヒトの染色体11にマップされている (Toribara, N.W. 他 (1993) J. Biol. Chem. 268:5879-5885)。ムチンは嚢胞性線維症と大腸癌の発達に関与することが示されている (Davril, M. (1999) Glycobiology 9:311321; Lindhorst, E. (2000) Tumour Biol. 21:116122)。

20

【0014】

エクステンシンは、ヒドロキシプロリンリッチな糖タンパク (HRGP) である。HRGPは構造かつ発生における重要な役割を果たすことが示されている (Hay, E.D. (1991) Cell Biology of Extracellular Matrix, Hay, E.D. 編集, Plenum, New York NY, 419-456ページ)。エクステンシンは一次膜の主要成分であるが、その一様でない分布はより組織特異的機能を示唆している。エクステンシンは、セリン残基の後にある4つのヒドロキシプロリン残基から成る反復モチーフによって特徴付けられる (Varner, J.E. および L.S. Lin (1989) Cell 56:231239)。エクステンシンの不溶化は、過酸化水素の媒介による酸化的架橋を伴うが、共存する過酸化酵素によって触媒され、微生物の攻撃、傷害、またはその他のストレスによって誘導される (Cooper, J.B. および J.E. Varner (1984) Plant Physiol. 76:414417)。

30

40

【0015】

新規の糖結合タンパク質、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、細胞増殖異常、自己免疫/炎症性の疾患、生殖系疾患、および神経系疾患の診断・治療・予防において有用であり、また、糖結合タンパク質の核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価にも有用である。

【0016】

(発明の概要)

本発明は、総称して「CARBAP」、個別にはそれぞれ「CARBAP-1」と「CARBAP-2」と呼ぶ糖結合タンパク質である精製されたポリペプチドを提供する。或る

50

実施態様において本発明は、(a) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫原性断片を含む群から選択した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 - 2 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0017】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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、および(d) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群より選択されたポリペプチドをコードするような単離されたポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したポリペプチドをコードする。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO: 3 - 4 を有する群から選択される。

10

【0018】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 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原性断片からなる群から選択したポリペプチドをコードするようなポリヌクレオチドと機能的に連結したプロモーター配列を有する組換えポリヌクレオチドを提供する。一実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞を提供する。別の実施態様では、本発明は組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体を提供する。

20

【0019】

また、本発明は、(a) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 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原性断片からなる群から選択し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回収する過程とを有し、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連結したプロモーター配列を有する。

30

40

【0020】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%同一である天然のアミノ酸配列を含むポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 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原性断片から構成される群から選択されたポリペプチドに特異結合するような単離された抗体を提供する。

【0021】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 3 - 4 からなる群から選択したポリヌクレオチ

50

ド配列を有するポリヌクレオチド、(b) SEQ ID NO: 3 - 4 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%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、(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、および(e)(a)~(d)のRNA等価物からなる群から選択された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。

【0022】

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: 3 - 4 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: 3 - 4 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%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(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、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の配列を有する。検出方法は、(a)サンプル中の前記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。

10

20

【0023】

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: 3 - 4 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: 3 - 4 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%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(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。

30

【0024】

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 - 2 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 - 2 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を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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の生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO: 1 - 2 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片からなる群れから選択される。一実施例では、SEQ ID NO: 1 - 2 からなる群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、機能的CARBAP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し、その内には患者にこの組成物を投与することが含まれる。

40

【0025】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO: 1 - 2 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 - 2 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を有するポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1 - 2 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、および(d) SEQ ID NO: 1 - 2 からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原

50

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。また別の実施態様において、本発明は、機能的CARBAPの発現低下に関連する疾患または病状を治療する方法を提供し、そのような治療を必要とする患者に対して成分を投与する過程を含む。

【0026】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 1-2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: 1-2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を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO: 1-2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: 1-2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、この組成物の患者への投与を含む、機能的CARBAPの過剰発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。。

10

20

【0027】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 1-2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: 1-2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を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO: 1-2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: 1-2からなる群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片を含む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つの試験化合物と混合させる過程と、(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

【0028】

本発明は更に、(a)SEQ ID NO: 1-2を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチド、(b)SEQ ID NO: 1-2を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列を有するポリペプチド、(c)SEQ ID NO: 1-2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: 1-2を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫原性断片を含む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のポリペプチドの活性の変化は、ポリペプチドの活性を調節する化合物であることを意味する。

40

【0029】

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: 3-4を有する群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、(a)標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b)標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程とを含む。

【0030】

50

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: 3 - 4 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: 3 - 4 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%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(iii) (i) に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、(iv) (ii) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、(v) (i) ~ (iv) のRNA等価物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を含むプローブを用いて、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、前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、前記標的ポリヌクレオチドは、(i) SEQ ID NO: 3 - 4 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: 3 - 4 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%の同一性を有する天然のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、(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との差は、試験化合物の毒性を意味する。

10

20

【0031】

(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あることも併せて理解されたい。

【0032】

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。

30

【0033】

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。

40

【0034】

(定義)

用語「CARBAP」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CARBAPのアミノ酸配列を指す。

【0035】

50

「アゴニスト」という用語は、C A R B A Pの生物活性を強化あるいは模倣する分子を指す。このアゴニストは、C A R B A Pに直接相互作用するか、或いはC A R B A Pが関与する生物学的経路の成分と作用して、C A R B A P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。

【0036】

用語「対立遺伝子変異配列」は、C A R B A P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つ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。

10

【0037】

C A R B A P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、C A R B A Pと同じポリペプチド或いはC A R B A P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、C A R B A P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合或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにC A R B A P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」し得るものであり、サイレント変化を生ぜしめて結果的に機能的に等価なC A R B A Pとなるようなアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含み得る。意図的なアミノ酸置換は、生物学的或いは免疫学的にC A R B A P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。

20

30

【0038】

用語「アミノ酸」及び「アミノ酸配列」は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質配列、或いはそれらの任意の断片を指し、天然の分子及び合成分子を含む。「アミノ酸配列」が天然のタンパク質分子の配列を指す場合、「アミノ酸配列」及び類似の用語は、アミノ酸配列を記載したタンパク質分子に関連する完全で元のままのアミノ酸配列に限定するものではない。

【0039】

用語「増幅」は、核酸配列の複製物を作製することに関連する。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。

【0040】

用語「アンタゴニスト」は、C A R B A P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、C A R B A Pに直接相互作用するか、或いはC A R B A Pが関与する生物学的経路の成分と作用して、C A R B A P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。

40

【0041】

用語「抗体」は、エピトープの決定基と結合することができる、そのままの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。C A R B A Pポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、そのままのポリペプチド、または関心のある小ペプチドを含む断片を用いて作製可能である。動物（マウス、ラット、ウサギ等）を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学

50

合成によって得られるポリペプチドまたはオリゴペプチドに由来し得るもので、好みに応じてキャリアタンパク質に抱合することも可能である。通常用いられるキャリアー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スカシガイのヘモシアニン(K L H)等がある。その結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

【0042】

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

10

【0043】

用語「アプタマー」は、特定の分子標的に結合する核酸またはオリゴヌクレオチドを指す。アプタマーは*in vitro*の進化過程(例えば米国特許番号第5,270,163号に記載されたSELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment))から由来するもので、そのような過程は大きな組み合わせライブラリから標的特異的なアプタマー配列を選択する。アプタマー組成は、2本鎖または1本鎖であってもよく、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ヌクレオチド誘導體、または他のヌクレオチド様分子を含み得る。アプタマーのヌクレオチド成分は、修飾された糖基(例えばリボヌクレオチドの2'-OH基が2'-Fまたは2'-NH₂で置換し得る)を有することが可能で、そのような糖基はヌクレアーゼへの抵抗性または血液中でのより長い寿命などの望ましい性質に改善し得る。循環系からアプタマーが除去される速度を遅くするために、アプタマーを高分子量キャリアー等の分子に抱合させることができる。アプタマーは、たとえば架橋剤の光活性化によって各々のリガンドと特異的に架橋させることができる(Brody, E. N. および L. Gold (2000) J. Biotechnol. 74:5-13等を参照)。

20

【0044】

「イントラマー(intramer)」の用語は*in vivo*で発現されるアプタマーを意味するたとえば、ワクシニアウイルスに基づくRNA発現系は、白血球の細胞質で特定のRNAアプタマーが高レベルで発現するために使用されている(Blind, M. 他(1999) Proc. Natl Acad. Sci. USA 96:3606-3610)。

30

【0045】

「スピーゲルマー(spiegelmer)」の語はL-DNA、L-RNAその他の左旋性ヌクレオチド誘導體またはヌクレオチド様分子を含むアプタマーを指す。左旋性のヌクレオチドを含むアプタマーは右旋性ヌクレオチドに作用する天然の酵素による分解に対して耐性がある。

【0046】

本明細書において「アンチセンス」は、特定の核酸配列のセンス(コーディング)鎖と塩基対を形成し得る任意の組成物を指す。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ある。アンチセンス分子は、化学合成または転写を含む任意の方法で製造することができる。相補的アンチセンス分子は、ひとたび細胞に導入されたら、細胞が形成した天然の核酸配列と塩基対を形成し、転写または翻訳を妨害する二重鎖を形成する。「負」または「マイナス」という表現は、ある参考DNA分子のアンチセンス鎖を意味し、「正」または「プラス」という表現はセン

40

50

ス鎖を意味する。

【0047】

用語「生物学的に活性」は、天然分子の構造的、調節的、或いは生化学的な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CARBAP、合成のCARBAP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。

【0048】

用語「相補的」は、塩基対合によってアニールする2つの一本鎖核酸配列間の関係を指す。例えば、配列「5' A - G - T 3'」は、相補配列「3' T - C - A 5'」と対を形成する。

10

【0049】

「所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物」または「所定のアミノ酸配列を含む組成物」は広い意味で、所定のポリヌクレオチド配列若しくはアミノ酸配列を含む任意の組成物を指す。この成分には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。CARBAP若しくはCARBAP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）及びその他の構成成分（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。

20

【0050】

「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。

30

【0051】

用語「保存的なアミノ酸置換」は、元のタンパク質の特性を殆ど変えない置換を指す。即ち、置換によってそのタンパク質の構造や機能が大きくは変わらず、そのタンパク質の構造、特にその機能が保存される。下表は、タンパク質中で元のアミノ酸と置換され得るアミノ酸と、保存アミノ酸置換と認められるアミノ酸を示している。

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

40

50

Th r	S e r , V a l
Tr p	P h e , T y r
T y r	H i s , P h e , T r p
V a l	I l e . L e u , T h r

保存アミノ酸置換では通常、(a)置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えば シートや 螺旋構造、(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。

【0052】

用語「欠失」は、1個以上のアミノ酸残基が欠如するアミノ酸配列の変化、或いは1個以上のヌクレオチドが欠如する核酸配列の変化を指す。

10

【0053】

用語「誘導体」は、化学修飾されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。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の少なくとも1つの生物学的若しくは免疫学的機能を保持するプロセスによって、修飾されたポリペプチドである。

【0054】

「検出可能な標識」は、測定可能な信号を発生し得る、ポリヌクレオチドやポリペプチドに共有結合或いは非共有結合するレポーター分子や酵素を指す。

20

【0055】

「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(上方調節)、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の欠損を指す。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。

【0056】

「エキソンシャフリング」は、異なるコード領域(エキソン)の組換えを意味する。1つのエキソンがコードされたタンパク質の1つの構造的または機能的ドメインを代表し得るため、安定したサブストラクチャーを再分類することによって、新しいタンパク質が組立てられることが可能であり、新しいタンパク質機能の進化を促進できる。

30

【0057】

用語「断片」は、CARBAPまたはCARBAP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、定義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。

40

【0058】

SEQ ID NO: 3-4の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO: 3-4を特定に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO: 3-4のある断片は、例えば、ハイブリダイゼーションや増幅

50

技術、またはSEQ ID NO: 3 - 4を関連ポリヌクレオチド配列から区別する類似の方法に有用である。SEQ ID NO: 3 - 4の断片の正確な長さ及び断片に対応するSEQ ID NO: 3 - 4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。

【0059】

SEQ ID NO: 1 - 2のある断片は、SEQ ID NO: 3 - 4のある断片によってコードされる。SEQ ID NO: 1 - 2のある断片は、SEQ ID NO: 1 - 2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 - 2のある断片は、SEQ ID NO: 1 - 2を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。ある断片と一致するSEQ ID NO: 1 - 2の正確な断片の長さや領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

10

【0060】

「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。

【0061】

「相同性」の語は、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類似性、または配列同一性を意味する。

【0062】

ポリヌクレオチド配列についての用語「一致率」または「一致性%」とは、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る、2つ以上のポリヌクレオチド配列間の一致する残基の百分率のことである。このようなアルゴリズムは、2配列間のアラインメントを最適化するために比較する配列において、標準化された再現性のある方法でギャップを挿入するので、2つの配列をより有意に比較できる。

20

【0063】

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の一部であり、一式の分子生物学分析プログラム(DNA STAR, Madison WI)である。CLUSTAL Vについては、Higgins, D.G. およびP.M. Sharp (1989) CABIOS 5: 151 - 153及びHiggins, D.G. 他 (1992) CABIOS 8: 189 - 191の文献に記載されている。ポリヌクレオチド配列の対をなすアラインメントの場合、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。デフォルトとして「重みづけされた」残基の重みづけ表を選択する。一致率は、アラインメントされたポリヌクレオチド配列間の「類似性パーセント」としてCLUSTAL Vによって報告される。

30

【0064】

或いは、一般的に用いられ且つ自由に入手できる配列比較アルゴリズム一式が、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) から提供されており(Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410)、これは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/>)を含む幾つかの情報源から入手可能である。このBLASTソフトウェア一式には、既知のポリヌクレオチド配列と様々なデータベースの別のポリヌクレオチド配列とのアラインメントに用いられる「blastn」を含む、様々な配列分析プログラムが含まれる。「BLAST 2 Sequences」と呼ばれるツールが入手可能であり、2つのヌクレオチド配列の対を直接比較するために用いられる。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi>.

40

50

n l m . n i h . g o v / g o r f / b 1 2 . h t m l にアクセスして、対話形式で利用ができる。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn 及び blastp (以下に記載)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場合、ある者は、デフォルトパラメータに設定された「BLAST 2 Sequences」ツール Version 2.0.12 (April - 21 - 2000)でblastn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。

【0065】

```
Matrix : B L O S U M 6 2
Reward for match : 1 1
Penalty for mismatch : - 2
Open Gap : 5 及び Extension Gap : 2 penalties
Gap x drop-off : 5 0
Expect : 1 0
Word Size : 1 1
Filter : on
```

10

一致率は、ある定義された配列の全長(例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列)で測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな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。

20

【0066】

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。

【0067】

ポリペプチド配列に用いられる用語「一致率」または「一致性%」とは、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る2つ以上のポリペプチド配列間の一致する残基の百分率のことである。ポリペプチド配列アラインメントの方法は公知である。保存的アミノ酸置換を考慮するアラインメント方法もある。既に詳述したこのような保存的置換は通常、置換部位の酸性度及び疎水性を保存するので、ポリペプチドの構造を(従って機能も)保存する。

30

【0068】

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

40

【0069】

或いは、NCBI BLASTソフトウェア一式を用いてもよい。例えば、2つのポリペプチド配列を対で比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「BLAST 2 Sequences」ツール Version 2.0.12 (Apr - 21 -

50

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。

【0070】

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

一致率は、ある定義された配列の全長（例えば特定のSEQ IDナンバーで定義された配列）で測定し得る。或いは、より短い長さ、例えば、定義された、より大きな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、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。

10

【0071】

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

20

【0072】

用語「ヒト化抗体」は、もとの結合能力を保持しつつよりヒトの抗体に似せるために、非抗原結合領域のアミノ酸配列が変えられた抗体分子を指す。

【0073】

「ハイブリダイゼーション」とは、所定のハイブリダイゼーション条件下で、ある一本鎖ポリヌクレオチドがある相補的な一本鎖と塩基対を形成するアニーリングのプロセスである。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。アニーリングが許容される条件下で、特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成され、「洗浄」過程の後もハイブリダイズしたままである。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できる。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 x SSC、約1% (w/v)のSDS、並びに約100 µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

30

【0074】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特異配列の融点(T_m)より約5 ~ 20 低くなるように選択する。このT_mは、所定のイオン強度及びpHの条件下で、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 他 (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。

40

【0075】

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 x SSC及び約0.1%のSDSの存在の下、約68 で1時間の洗浄過程を

50

含む。別法では、65、60、55、または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的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。例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションのような特定条件下では、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。

10

【0076】

用語「ハイブリダイゼーション複合体」は、相補的な塩基間の水素結合によって、形成された2つの核酸配列の複合体を指す。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(C₀tまたはR₀t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板であって細胞若しくはその核酸が固定される基板)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。

【0077】

用語「挿入」或いは「付加」は、1個以上のアミノ酸残基或いはヌクレオチドがそれぞれ追加されるアミノ酸配列或いは核酸配列の変化を指す。

20

【0078】

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

【0079】

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CARBAP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CARBAPのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

30

【0080】

用語「マイクロアレイ」は、基板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。

【0081】

用語「エレメント」または「アレイエレメント」は、マイクロアレイ上に固有の指定された位置を有する、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはその他の化合物を指す。

【0082】

用語「調節」は、CARBAPの活性の変化を指す。例えば、調節によって、CARBAP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。

40

【0083】

「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。

【0084】

「機能的に連結した」は、第1の核酸配列と第2の核酸配列が機能的な関係にある状態を指す。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連結している。同一のリーディングフレーム

50

内で2つのタンパク質コード領域を接続する必要がある場合、一般に、機能的に連結したDNA配列は非常に近接するか、或いは連続的に隣接し得る。

【0085】

「ペプチド核酸(PNA)」は、末端がリシンで終わるアミノ酸残基のペプチドの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を含む、アンチセンス分子または抗遺伝子剤を指す。末端のリシンは、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伸長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。

【0086】

CARBA P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、CARBA Pの酵素環境に依存し、細胞の種類によって異なり得る。

【0087】

「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、CARBA P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」とは、相補的な塩基対を形成して標的のポリヌクレオチドにアニーリング可能な、通常はDNAオリゴヌクレオチドである短い核酸である。プライマーは次に、DNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って延長し得る。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。

【0088】

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。

【0089】

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. 他(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, 1-3巻, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY、Ausubel, F.M. 他, (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publi. Assoc. & Wiley-Intersciences, New York NY、Innis他(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。

【0090】

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キロボースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似

10

20

30

40

50

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（Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research（マサチューセッツ州ケンブリッジ）より入手可能）によって、ユーザーは、プライマー結合部位として避けたい配列を指定できる「非プライミングライブラリ」を入力できる。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、それぞれの情報源から得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい）。PrimerGenプログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト-リソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有であって保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えばPCRまたはシーケンシングプライマーとして、マイクロアレイエレメントとして、或いは核酸のサンプルにおいて完全または部分的相補的ポリヌクレオチドを同定する特異プローブとして有用である。オリゴヌクレオチドの選択方法は、上記の方法に限定されるものではない。

10

20

【0091】

本明細書における「組換え核酸」は天然の配列ではなく、2つ以上の配列の離れたセグメントを人工的に組み合わせた配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばのSambrookらの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的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連結した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、例えばある細胞を形質転換するために使用されるベクターの一部とすることが可能である。

30

【0092】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの一部であって、例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。そのようなワクシニアウイルスは哺乳動物に接種され、その組換え核酸が発現されて、その哺乳動物ないで防御免疫応答を誘導するように使用することができる。

【0093】

「調節エレメント」は、通常は遺伝子の非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'の非翻訳領域（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タンパク質またはウイルスタンパク質と相互作用する。

40

【0094】

「レポーター分子」は、核酸、アミノ酸または抗体の標識に用いられる化学的または生化学的部分である。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。

【0095】

本明細書において、DNA配列に対する「RNA等価物」とは、基準となるDNA配列と同じ直鎖の核酸配列から構成されるが、窒素性塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖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なる。

【0096】

用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。CARBOAP、CARBO

50

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

【0097】

用語「特異的結合」及び「特異的に結合する」は、タンパク質若しくはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、若しくは任意の天然若しくは合成の結合組成物との間の相互作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存していることを意味している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、結合していない標識した「A」及び抗体を含む反応液に、エピトープAを含むポリペプチド或いは結合していない無標識の「A」が存在すると、抗体と結合する標識Aの量が減少する。

10

【0098】

用語「実質的に精製された」は、自然の環境から取り除かれてから、単離或いは分離された核酸配列或いはアミノ酸配列であって、自然に結合している組成物が少なくとも約60%除去されたものであり、好ましくは約75%以上の除去、最も好ましくは90%以上除去されたものを指す。

【0099】

「置換」とは、一つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドをそれぞれ別のアミノ酸またはヌクレオチドに置き換えることである。

20

【0100】

用語「基板」は、任意の好適な固体或いは半固体の支持物を指し、膜及びフィルター、チップ、スライド、ウエハ、ファイバー、磁気または非磁気ビード、ゲル、チューブ、プレート、ポリマー、微小粒子、毛細管が含まれる。基板は、壁、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、基板表面にはポリヌクレオチドやポリペプチドが結合する。

【0101】

「転写イメージ」は、所定条件下での所定時間における特定の細胞の種類または組織による集合的遺伝子発現のパターンを指す。

【0102】

「形質転換」とは、外来DNAが受容細胞に導入されるプロセスのことである。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宿主細胞または真核宿主細胞に挿入する任意の既知の方法を基にし得る。形質転換の方法は、形質転換する宿主細胞の種類によって選択する。限定するものではないが形質転換方法には、ウイルス感染、電気穿孔法（エレクトロポレーション）、熱ショック、リポフェクション及び微粒子銃を用いる方法がある。「形質転換された」細胞には、導入されたDNAが自律的に複製するプラスミドとして或いは宿主染色体の一部として複製可能である安定的に形質転換された細胞が含まれる。さらに、限られた時間に一過的に導入DNA若しくは導入RNAを発現する細胞も含まれる。

30

【0103】

ここで用いる「遺伝形質転換体」とは任意の生物体であり、限定するものではないが動植物を含み、生物体の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試験管内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（trans conjugation）によって宿主に導入することができる。本発明のDNA

40

50

をこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出の S a m b r o o k 他 (1 9 8 9) 等の参考文献に与えられている。

【 0 1 0 4 】

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 4 0 % 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「B L A S T 2 S e q u e n c e s」ツール V e r s i o n 2 . 0 . 9 (1 9 9 9 年 5 月 7 日) を用いて b l a s t n 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 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 8 5 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 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「多型性」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、m R N A プロセッシング中のエキソンの異なるスプライシングによって通常、ポリヌクレオチドがより多くまたはより少数の塩基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、種によって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。多型性変異体は、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中での変異である。多型変異配列はまた、ポリヌクレオチド配列の 1 つのヌクレオチドが異なる「1 塩基多型性」 (S N P) も含み得る。S N P 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。

【 0 1 0 5 】

特定のポリペプチド配列の「変異体」とは、デフォルトパラメータ設定の「B L A S T 2 S e q u e n c e s」ツール V e r s i o n 2 . 0 . 9 (1 9 9 9 年 5 月 7 日) を用いる b l a s t p によって、ある核酸配列のある長さに対する該特定のポリペプチド配列の同一性が、少なくとも 4 0 % と決定されたポリペプチド配列のことである。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 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【 0 1 0 6 】

(発明)

本発明は、新規の糖結合タンパク質 (C A R B A P) の発見、C A R B A P をコードするポリヌクレオチド、および、細胞増殖異常、自己免疫 / 炎症疾患、生殖系疾患、および神経系疾患の診断、治療、ならびに予防に対するこれらの組成の使用に基づいている。

【 0 1 0 7 】

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 I n c y t e プロジェクト識別番号 (I n c y t e プロジェクト I D) 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 S E Q I D N O) と I n c y t e ポリペプチド配列番号 (I n c y t e ポリペプチド I D) 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 S E Q I D N O) と I n c y t e ポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (I n c y t e ポリヌクレオチド I D) によって表示した。

【 0 1 0 8 】

表 2 は、G e n B a n k タンパク質 (g e n p e p t) データベースに対する B L A S T 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 (ポリペプチド S E Q I D N O :) およびそれに対応する I n c y t e ポリペプチド配列番号 (I n c y t e ポリペプチド I D) を示す。列 3 は、G e n B a n k の最も近い相同体の G e n B a n k の識別番号 (G e n b a n k I D N O :) を示す。列 4 は、各ポリペプチドとその G e n B a n k 相同体との間の一致を表す確率スコアを

示す。列5は、G w n B a n k 相同体の注釈を示す。

【0109】

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 (S E Q I D N O :) およびそれに対応する I n c y t e ポリペプチド配列番号 (I n c y t e ポリペプチド I D) 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、G C G 配列分析ソフトウェアパッケージの M O T I F S プログラム (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n W I) 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。

10

【0110】

表2及び表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糖結合タンパク質であることを確立している。例えば、S E Q I D N O : 1 はブタの胃ムチン (G e n B a n k I D g 9 1 5 2 0 8) と28%の同一性を有することが B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l (B L A S T) によって示された。B L A S T 確率スコアは $7.9e-15$ であり、これは観察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。S E Q I D N O : 2 は、同様に解析され注釈が付けられた。S E Q I D N O : 1 - 2 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。

20

【0111】

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、c D N A 配列またはゲノム D N A 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ることで構築した。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 (ポリヌクレオチド S E Q I D N O :) およびそれに対応する I n c y t e ポリヌクレオチドコンセンサス配列番号 (I n c y t e ポリヌクレオチド I D) 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、S E Q I D N O : 3 - 4 を同定するため、或いは S E Q I D N O : 3 - 4 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c D N A 配列、ゲノム D N A から予想されたコード配列 (エキソン) 及び/またはc D N A 及びゲノム D N A 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c D N A 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。

30

【0112】

表4の列5の識別番号は、特に例えば I n c y t e c D N A とそれに対応するc D N A ライブラリを指す場合もある。例えば、7050545H1は I n c y t e c D N A 配列の識別番号であり、B R A C N O K 0 2 はそれが由来するc D N A ライブラリの識別番号である。c D N A ライブラリが示されていない I n c y t e c D N A は、プールされているc D N A ライブラリ (例えば、70851245V1) に由来する。または、列5の識別番号は、ポリヌクレオチド配列の組み立てに用いた G e n B a n k のc D N A すなわち E S T (例えば、g1698302) の識別番号の場合もある。さらに、列5の識別番号は、E N S E M B L (T h e S a n g e r C e n t r e , 英国ケンブリッジ) データベースから由来した配列を同定し得る (即ち「E N S T」命名を含む配列) 。或いは、列5の識別番号は、N C B I R e f S e q N u c l e o t i d e S e q u e n c e R e c o r d s データベースから由来する場合もあり (即ち「N M」または「N T」の命名を含む配列) 、また N C B I R e f S e q P r o t e i n S e q u e n c e R e c o r d s から由来する場合もある (即ち「N P」の命名を含む配列) 。または列5の識別

40

50

番号は、「エキソンスティッチング(exon-stitching)」アルゴリズムにより結び合わせたcDNA及びGenscan予想エキソンの両方からなる群を意味する場合がある。例えば、FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄は「スティッチされた」配列であり、その内、XXXXXXはアルゴリズムが適用される配列のクラスターの識別番号であり、YYYYYはアルゴリズムにより生み出される予測の数であり、N₁, N₂, N₃, N₄がある場合には、解析中に手動で編集された特定のエキソンを表す(実施例5参照)。または、列5の識別番号は「エキソンストレッチング(exon-stretching)」アルゴリズムにより結び合わせたエキソンの集合を指す場合もある。例えば、FLXXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_Nは「ストレッチ」配列の識別番号である。ここでXXXXXXはIncyteプロジェクト識別番号、gAAAAAは「エキソンストレッチング」アルゴリズムを適用したヒトゲノム配列のGenBank識別番号、gBBBBBは一番近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号、またはNCBI RefSeq識別番号、Nは特定のエキソンである(実施例5を参照)。あるRefSeq配列が「エキソンストレッチング」アルゴリズムのためのタンパク質相同体として使用された場合には、RefSeq識別番号(「NM」、「NP」、または「NT」によって表される)が、GenBank識別(即ち、gBBBBB)の代わりに使用される場合もある。

10

【0113】

或いは、接頭コードは、手動で編集された構成配列、ゲノムDNA配列から予測された構成配列、または組み合わされた配列解析方法から由来する構成配列を同定する。次の表は、構成配列の接頭コードと、接頭コードに対応する配列分析方法の例を列記する(実施例4と5を参照)。

20

接頭コード	解析タイプやプログラムの例	
GNN, GFG, ENST	例えば、GENSCAN (Stanford University, CA, USA) または FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK)を用いたゲノム配列からのエキソン予測	10
GBI	手動で編集されたゲノム配列の解析	
FL	スティッチまたはストレッチゲノム配列(実施例5参照)	20
INCY	EST 配列のゲノムへのマッピングからの全長転写とエキソンの 予想エキソンと転写を予想するために、ゲノム位置と EST 構成 データが組み合わされる。	

10

20

30

40

50

【0114】

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に列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、それに関連する Incyte cDNA 識別番号は示さなかった。

【0115】

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代表される Incyte cDNA ライブラリである。cDNA ライブラリを作製するために用いた組織及びベクターを表5に示し、表6で説明している。

【0116】

本発明はまた、CARBAP の変異体も含む。好適な CARBAP の変異体は、CARBAP アミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、あるいは少なくとも約90%、さらには少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有し、CARBAP の機能的または構造的な特徴を少なくとも1つ含む変異体である。

【0117】

本発明はまた、CARBAP をコードするポリヌクレオチドを含む。特定の実施例において、本発明は、CARBAP をコードする SEQ ID NO: 3-4 からなる群から選択した配列を含むポリヌクレオチド配列を含む。配列表に示した SEQ ID NO: 3-4 のポリヌクレオチド配列は、窒素系塩基のチミンがウラシルに置換され、糖鎖のバックボ

ーンがデオキシリボースではなくリボースからなる等価RNA配列を含む。

【0118】

本発明はまた、CARBAP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、CARBAP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: 3-4からなる群から選択されたアミノ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: 3-4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、CARBAP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。

10

【0119】

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

20

【0120】

CARBAP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CARBAP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含むCARBAP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。宿主が特定のコドンを利用する頻度に基づいて、特定の真核宿主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、CARBAP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。

30

【0121】

本発明はまた、CARBAP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CARBAP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。

【0122】

更に本発明には、種々のストリンジェントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO: 3-4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。

40

【0123】

DNAシーケンシングの方法は当分野では公知であり、本発明のいずれの実施例も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 (Amersha

50

m, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム(Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB 2200液体転移システム(Hamilton, Reno, NV)、PTC 200サーマルサイクラー(MJ Research, Watertown MA)及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー(Applied Biosystems)等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ABI 373 或いは 377 DNAシー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(例えば、Ausubel, F.M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 7.7ユニット、Meyers, R.A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856 - 853ページを参照)。

【0124】

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、CARBAPをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である(Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic 2: 318 - 322等を参照)。別の方法に逆PCR法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列からなる制限酵素断片から得る(Triglia, T. 他(1988) Nucleic Acids Res 16: 8186等を参照)。第3の方法としてキャプチャPCR法があり、これはヒト及び酵母菌人工染色体DNAの既知の配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する方法に関与している(Lagerstrom, M. 他(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ライゲーション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. 他(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。

【0125】

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

【0126】

市販の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、発光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。

10

【0127】

本発明の別の実施例では、CARBAP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CARBAP、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CARBAPのクローン化及び発現に利用可能である。

【0128】

種々の目的でCARBAP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を介した部位特異的変異誘導を利用して、新規な制限部位の作製、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起こす突然変異を導入し得る。

20

【0129】

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、CARBAP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CARBAPの生物学的特性を変更或いは改良することができる。DNAシャッフリングは、遺伝子断片のPCRを介する組換えを用いて遺伝子変異体のライブラリを作製するプロセスである。ライブラリはその後、その遺伝子変異体を所望の特性に同定するような選択またはスクリーニングにかける。次にこれらの好適な変異体をプールし、更に反復してDNAシャッフリング及び選択/スクリーニングを行ってもよい。従って、人工的な育種及び急速な分子の進化によって多様な遺伝子が作られる。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、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。

30

40

【0130】

別の実施例によれば、CARBAP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. 他(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 7:215-223; 及びHorn, T. 他(1980) Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232を参照)。別法として、化学的方法を用いてCARBAP自体または

50

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, W H Freeman, New York NY, 55-60 ページ、Roberge, J. Y. 他 (1995) Science 269:202-204 等を参照)。自動合成は ABI 431A ペプチドシンセサイザ (Applied Biosystems) を用いて達成し得る。更に CARBAP 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。

10

【0131】

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. 及び 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)。

【0132】

生物学的に活性な CARBAP を発現させるために、CARBAP 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 CARBAP をコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、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、CARBAP 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。CARBAP 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。発現の効率は、用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを包含することによって高めることができる (Scharf, D. ら (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162. 等を参照)。

20

30

【0133】

当業者に周知の方法を用いて、CARBAP 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)。

40

【0134】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、CARBAP 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

50

ザイクウイルスC a M VまたはタバコモザイクウイルスT M V)または細菌発現ベクター(例えばTiまたはp B R 3 2 2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S a m b r o o k、前出のA u s u b e l、V a n H e e k e, G. 及びS. M. S c h u s t e r (1989) J. Biol. Chem. 264:5503-5509、S a n d i g, V. 他(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945、T a k a m a t s u, N. (1987) E M B O 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、L o g a n, J. 及びT. S h e n k (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659、H a r r i n g t o n, J. J. 他(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(D i N i c o l a, M. 他(1998) Cancer Gen. Ther. 5(6):350-356、Y u, M. 他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(13):6340-6344、B u l l e r, R. M. 他(1985) Nature 317(6040):813-815; M c G r e g o r, D. P. 他(1994) Mol. Immunol. 31(3):219-226、V e r m a, I. M. およびN. S o m i a (1997) Nature 389:239-242等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。

【0135】

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。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、C A R B A P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、C A R B A P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、P B L U E S C R I P T (S t r a t a g e n e, L a J o l l a C A)またはp S P O R T 1プラスミド(G I B C O B R L)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C A R B A Pをコードする配列をライゲーションするとl a c Z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*i n v i t r o*転写、ジデオキシのシークエンシング、ヘルパーファージによる一本鎖のレスキュー、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう(V a n H e e k e, G. およびS. M. S c h u s t e r (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C A R B A Pが必要な場合は、C A R B A P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。

【0136】

酵母の発現系を使用してC A R B A Pを産出し得る。因子、アルコールオキシダーゼ、P G H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、出芽酵母菌(S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e)またはピキア酵母(P i c h i a p a s t o r i s)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を分泌或いは細胞内への保持のいずれかに誘導し、安定した増殖のために外来配列の宿主ゲノムへの組込みを可能にする(前出のA u s u b e l (1995)、B i t t e r, G. A. 他(1987) Methods Enzymol. 153:516544、S c o r e r, C. A. 他(1994) Bio/Technology 12:181-184等を参照)。

【0137】

10

20

30

40

50

植物系を使用してCARBAPを発現することも可能である。CARBAPをコードする配列の転写は、ウイルスプロモーター、例えば単独あるいはTMV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および19Sプロモーターによって促進される(Takamatsu, N. (1987) EMBO J. 6:307311)。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(Coruzzi, G. 他(1984) EMBO J. 3:16711680、Broglie, R. 他(1984) Science 224:838843、Winter, J. 他(1991) Results Probl. Cell Differ. 17:85105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)。

【0138】

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CARBAPをコードする配列を連結し得る。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CARBAP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。

【0139】

ヒト人工染色体(HAC)を用いて、プラスミドに含まれ且つプラスミドから発現するものより大きなDNAの断片を輸送することもできる。治療のために約6kb~10MbのHACsを作製し、従来の送達方法(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)。

【0140】

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CARBAP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、CARBAP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。

【0141】

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、tk^r細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、apr^r細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある(例えば、Wigler, M. 他(1977) Cell 11:223-232、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. 他(1980) Proc. Natl. Acad. S

ci. USA 77:3567-3570、Colbere-Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14 等を参照)。その他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変える *trpB* 及び *hisD* は、文献に記載されている (Hartman, S. C. 及び R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051 等を参照)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、形質転換体を同定するだけでなく、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も可能である (Rhodes, C. A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131 等を参照)。

【0142】

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、CARBAP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、CARBAP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同定可能である。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CARBAPをコードする配列とタンデム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。

【0143】

一般に、CARBAPをコードする核酸配列を含み且つCARBAP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は免疫学的検定法がある。

【0144】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてCARBAPの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合した免疫吸着剤検定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、フローサイトメーター (FACS) などが挙げられる。CARBAP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イスイムノアッセイ (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. 他 (1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV, Coligan, J. E. 他 (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)。

【0145】

多岐にわたる標識方法及び抱合方法が、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。CARBAP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、CARBAPをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブの生成の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。

【0146】

CARBAP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。CARBAP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CARBAP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。

10

【0147】

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」形を切断する翻訳後のプロセッシングを利用して、標的タンパク質、折りたたみ及び/または活性を特定することが可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等)は、American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)から入手可能であり、外来タンパク質の正しい修飾及び処理を確実にするよう

20

【0148】

本発明の別の実施例では、CARBAP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ライゲーションさせる。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CARBAPタンパク質が、CARBAP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、CARBAP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、CARBAP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。

30

40

【0149】

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CARBAP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連結したタンパク質コード配列の転写及び翻訳をカップルさせる。翻訳は、例えば³⁵Sメチオニンのよう

50

な放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【0150】

本発明のCARBAPまたはその断片を用いて、CARBAP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、CARBAP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。

【0151】

ある実施態様では、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CARBAP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パートナー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）：5章などを参照）。同様に、化合物は、CARBAPが結合する天然受容体、ある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する場合がある。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。ある実施態様では、このような化合物に対するスクリーニングには、分泌タンパク質あるいは細胞膜上のタンパク質のいずれか一方としてCARBAP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、または大腸菌からの細胞が含まれる。CARBAPを発現する細胞またはCARBAPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、CARBAPまたは化合物のいずれかの結合、刺激または阻害を分析する。

10

20

【0152】

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、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その結合を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、溶液中のあるいは固体支持物に固定されたCARBAPと結合させるステップと、CARBAPとこの化合物との結合を検出するステップを含む場合がある。別法では、標識された競合物の存在下での試験化合物の結合の検出及び測定を行うことができる。更にこのアッセイでは、無細胞再構成標本、化学ライブラリまたは天然の生成混合物を用いて実施することができ、試験化合物は、溶液中で遊離させるか固体支持体に固定させる。

30

【0153】

本発明のCARBAPまたはその断片を用いて、CARBAP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。ある実施態様では、CARBAPの活性が許容される条件下でアッセイを実施し、そのアッセイでは少なくとも1つの試験化合物をCARBAPと混合し、試験化合物の存在下でCARBAPの活性を試験化合物不在下でのCARBAPの活性と比較する。試験化合物の存在下でのCARBAPの活性の変化は、CARBAPの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別の実施態様において、試験化合物をCARBAPの活性に適した条件下でCARBAP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。これらアッセイのいずれかにおいて、CARBAP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。

40

【0154】

別の実施態様では、胚性幹細胞（ES細胞）における相同組み換えを用いて動物モデル系内で、CARBAP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: Capecchi, M. R. (1989) Science 244:

50

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(Martha, 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。 10

【0155】

CARBAP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)。

【0156】

CARBAP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、CARBAPをコードするポリヌクレオチドのある領域を動物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。別の実施態様において、例えばCARBAPを乳汁内に分泌するなどCARBAP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)。

【0157】

(治療)

CARBAPのある領域と糖結合タンパク質の領域との間に、例えば配列およびモチーフの内容における化学的および構造的類似性が存在する。更に、CARBAPの発現は、副腎腫瘍組織および後部帯状組織に密接に関連する。従って、CARBAPは、細胞増殖異常、自己免疫/炎症性の疾患、生殖系疾患、および神経系疾患においてある役割を果たすと考えられる。CARBAPの発現または活性の増大に関連する疾患の治療においては、CARBAPの発現または活性を低下させることが望ましい。CARBAP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、CARBAPの発現または活性を増大させることが望ましい。 30

【0158】

CARBAP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、CARBAPの発現または活性を増大させることが望ましい。限定されるものではないが、そのような疾患として、細胞増殖異常には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフ 40 50

イ (A P E C E D)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膝炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、生殖系疾患には、プロラクチン産生障害、不妊症 (卵管疾患、排卵欠損症、子宮内膜症)、性周期障害、月経周期障害、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮筋腫、自己免疫疾患、子宮外妊娠、催奇形、乳がん、繊維嚢胞性乳房疾患、乳漏症、精子形成破壊、精子異常生理、精巣癌、前立腺癌、良性前立腺肥大、前立腺炎、パイロニー病、性交不能、男性乳癌、女性化乳房、高ゴナドトロピン性腺機能低下症、低ゴナドトロピン性腺機能低下症、偽性半陰陽、無精子症、早発性卵巣不全症、アクロシン欠乏症、思春期遅延、逆行性射精、無射精、および血管芽細胞腫、嚢胞褐色細胞腫 (c y s t s p h a e o c h r o m o c y t o m a s)、傍神経節腫、副睾丸の嚢腺腫、および内リンパ嚢腫瘍が含まれ、神経系疾患の中には、癩癧、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病 (クールー、クロイツフェルト ヤコブ病、ゲルストマン症候群、及び G e r s t m a n n - S t r a u s s l e r - S c h e i n k e r 症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫 (c e r e b e l l o r e t i n a l h e m a n g i o b l a s t o m a t o s i s)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系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 (S A D)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、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健忘症とが含まれる。

【 0 1 5 9 】

別の実施態様では、C A R B A P またはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与して、上記しだけに限られるものではないが疾患を含む C A R B A P の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【 0 1 6 0 】

さらに別の実施態様では、実質的に精製された C A R B A P を含む成分を好適な医薬用キャリアと共に患者に投与して、限定するものではないが上記した疾患を含む C A R B A P の発現または活性の低下に関連した疾患を治療または予防することも可能である。

【 0 1 6 1 】

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 C A R B A P 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、C A R B A P 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。

【 0 1 6 2 】

更なる実施例では、C A R B A P 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 C A R B A P のアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した細胞増殖異常、自己免疫 / 炎症性

の疾患、生殖系疾患、および神経系疾患が含まれる。一実施態様では、CARBAP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CARBAPを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【0163】

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CARBAP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、CARBAP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。

【0164】

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

10

【0165】

CARBAP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CARBAP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CARBAPと特異的に結合するものの同定が可能である。CARBAP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、Fab断片、及びFab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。

20

【0166】

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、CARBAP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、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシガイのヘモシニアン、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、BCG（カルメット ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム パルヴム（Corynebacterium parvum）が特に好ましい。

30

【0167】

CARBAP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。CARBAPのアミノ酸の短いストレッチは、KLH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。

40

【0168】

CARBAP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EBV-ハイブリドーマ技術がある（Kohler, G. 他（1975）Nature 256: 495-497、Kozbor, D. 他（1985）J. Immunol. Methods 81: 31-42、Cote, R. J. 他（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030、Cole, S. P. 他（1984）Mol. Cell Biol. 62: 109-120等を参照）。

【0169】

50

更に、「キメラ抗体」作製のために発達したヒト抗体遺伝子にマウス抗体遺伝子をスプライシングするなどの技術が、好適な抗原特異性及び生物学的活性を備える分子を得るために用いられる(例えば、Morrisson, S. L. 他. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 4851-4855; Neuberger, M. S. 他. (1984) Nature 312: 604-608; Takeda, S. 他 (1985) Nature 314: 452, 454を参照)。別法では、当分野で周知の方法を用いて、一本鎖抗体の産生のための記載された技術を適用して、CARBAP特異的一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイデオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる(Burton D. R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10134-10137等を参照)。

【0170】

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

【0171】

CARBAP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 $F(ab')_2$ 断片と、 $F(ab')_2$ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製される Fab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W. D. 他 (1989) Science 256: 1275-1281等を参照)。

【0172】

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性の検定のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このような免疫学的検定には、CARBAPとその特異性抗体との間の複合体の計測が含まれる。二つの非干渉性CARBAPエピトープに対して反応性の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、競合的な結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0173】

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、CARBAPに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数Kaで表すが、このKaは、平衡状態の下でCARBAP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CARBAP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Kaは、CARBAP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CARBAPエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体試薬のKaは、親和性の真の測定値を表す。Ka値が $10^9 \sim 10^{12}$ liter/molの高親和性抗体試薬は、CARBAP抗体複合体が過酷な処理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。Ka値が $10^6 \sim 10^7$ liter/molの低親和性抗体試薬は、CARBAP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. 及び Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal A

ntibodies, John Wiley & Sons, New York NY).

【0174】

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、CARBAP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(例えば、Catty、前出、Coligan 他、前出を参照)。

【0175】

本発明の別の実施例では、CARBAP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、治療目的で使用することができる。ある実施態様では、CARBAP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、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは大きな断片が、CARBAPをコードする配列の制御領域から、またはコード領域に沿ったさまざまな位置から設計可能である(Agrawal, S., 編集(1996) Antisense Therapeutics, Humana Press Inc., Totawa NJ 等を参照)。

【0176】

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送達することが可能である(Slater, J.E. 他(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3):469-475 及び Scanlon, K.J. 他(1995) 9(13):1288-1296. 等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(Miller, A.D. (1990) Blood 76:271、前出の Ausubel、Uckert, W. 及び W. Walther (1994) Pharmacol. Ther. 63(3):323-347 等を参照)。その他の遺伝子送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロップ及び当分野で公知のその他のシステムが含まれる(Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R. J. 他(1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315、Morris, M.C. 他(1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736. 等を参照)。

【0177】

本発明の別の実施例では、CARBAP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. 他(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症(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症(Blaese, R.M. 他(1995) Science 270:475-480、Bordignon, C. 他(1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症(Zabner, J. 他(1993) Cell 75:207-216; Crystal, R.G. 他(1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666、Crystal, R.G. 他(1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア(thalassemia)、家族性高コレステロール血症、第V I I I 因子若しくは第I X 因子欠損に起因する血友病(Crystal, 35 R.G. (1995)

10

20

30

40

50

Science 270:404-410、Verma, I. M. および Somia. N. (1997) Nature 389:239-242)を治療し、(ii)条件的致死性遺伝子産物を発現させ(例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii)細胞内の寄生生物(例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV))(Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschl, E. 他(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等の真菌寄生菌、並びに熱帯熱マラリア原虫及びクルーズトリパノソーマ等の原虫寄生生物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。CARBAP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CARBAP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。

10

【0178】

本発明の更なる実施例では、CARBAPの欠損による疾患や異常症は、CARBAP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CARBAP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 vivo 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がある(Morgan, R. A. 及び W. F. Anderson (1993) Annu. Rev. Biochem. 62:191-217、Ivics, Z. (1997) Cell 91:501-510; Boulay, J-L. 及び H. Recipon (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:445-450)。

20

【0179】

CARBAP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、PCR2-TOPOTA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。CARBAPを発現させるために、(i)恒常的に活性なプロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)、SV40ウイルス、チミジンキナーゼ(TK)、若しくは -アクチン遺伝子等)、(ii)誘導性プロモーター(例えば、市販されているT-REXプラスミド(Invitrogen)に含まれている、テトラサイクリン調節性プロモーター(Gossen, M. 及び 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. 及び 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. 及び H.M. Blau, 前出)、または(iii)正常な個体に由来するCARBAPをコードする内在性遺伝子の天然のプロモーター若しくは組織特異的プロモーターを用いることが可能である。

30

40

【0180】

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、

50

リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. 及び A. J. Eb (1973) *Virology* 52: 456 - 467) 若しくは電気穿孔法 (Neumann, B. 他 (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。

【0181】

本発明の別の実施例では、CARBAP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CARBAP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. 他 (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 6733 - 6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞株(VPCL)において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する親和性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVG等の汎親和性エンベロープタンパク質を発現する(Armentano, D. 他 (1987) *J. Virol.* 61: 1647 - 1650、Bender, M. A. 他 (1987) *J. Virol.* 61: 1639 - 1646、Adam, M. A. および A. D. Miller (1988) *J. Virol.* 62: 3802 - 3806、Dull, T. 他 (1998) *J. Virol.* 72: 8463 - 8471、Zufferey, R. 他 (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. 他 (1997) *J. Virol.* 71: 7020 - 7029、Bauer, G. 他 (1997) *Blood* 89: 2259 - 2267、Bonyhadi, M. L. (1997) *J. Virol.* 71: 4707 - 4716、Ranga, U. 他 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1201 - 1206、Su, L. (1997) *Blood* 89: 2283 - 2290)。

【0182】

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、CARBAP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CARBAP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. 他 (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. 他 (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19: 511 - 544 及び Verma, I. M. 及び 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。

【0183】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、CARBAP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CARBAP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CARBAP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
 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. 他(1999) Exp. Eye Res. 169:385-395)。HSV-10
 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 gen
 e 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、I
 CP27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. 他(1999) J.
 Virol. 73:519-532及びXu, H. ら(1994) Dev. B
 iol. 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。 20

【0184】

別法では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてCARBAP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. 及びK.-J. Li(1998) Cun. Opin
 . Biotech. 9:464-469)。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイル
 ス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、CARBAPをコードする配列をウイルスゲノ
 ムのキャプシッ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CARBAPをコードするRNAが産生され、高いレベルでCARBAPが合成さ
 れる。通常はウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウ
 イルス(SIN)の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞(BHK-21)の持続的な
 感染を確立する能力は、ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変
 更可能であることを示唆している(Dryga, S.A. 他(1997) Virol
 ogy 228:74-83)。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々な
 タイプの細胞にCARBAP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。ウイルスの感染性cDN
 Aクローンの処置方法、ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びウイルス
 の感染方法は、当業者に公知である。 30

【0185】

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
 50

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. 他(1994) in: Huber, B. E. 及び B. I. Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY, 163-177ページ等を参照)。相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってmRNAの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【0186】

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、人工的に作製されたハンマーヘッド型リボザイム分子が、CARBAPをコードする配列の内ヌクレオチド鎖分解性の切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

10

【0187】

任意のRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUU、GUC配列を含めたリボザイム切断部位に対して標的分子をスキャンすることによって先ず同定される。一度同定されると、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配列が、そのオリゴヌクレオチドを機能不全にするような2次構造の特徴をもっていないか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アクセス可能性をテストすることによって行うことができる。

20

【0188】

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学合成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、CARBAP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。

30

【0189】

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

40

【0190】

本発明の更なる実施例は、CARBAP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発現変化を起こすの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、CARBAP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、CARBAPをコードするポリ

50

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、CARBAP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、CARBAP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。

【0191】

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。CARBAP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。CARBAPをコードするポリヌクレオチドの発現における変化は、当分野で通常知られている任意の方法でアッセイする。通常、CARBAPをコードするポリヌクレオチドの配列に相補的なヌクレオチド配列を有するプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、特異ヌクレオチドの発現を検出する。ハイブリダイゼーション量を定量し、それによって1つ若しくは複数の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば分裂酵母 (Schizosaccharomyces pombe) 遺伝子発現系 (Atkins, D. 他 (1999) 米国特許第5,932,435号、Arndt, G.M. 他 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28: E15) またはHeLa細胞等のヒト細胞系 (Clarke, M.L. 他 (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. 他 (1997) 米国特許第5,686,242号、Bruice, T.W. 他 (2000) 米国特許第6,022,691号)。

【0192】

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

【0193】

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。

【0194】

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

などからなる。

【0195】

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。

【0196】

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当分野で公知である。高分子（例えばより大きなペプチド及びタンパク質）の場合には、当該分野において肺の肺泡領域を介しての肺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. 他, 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。

10

【0197】

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。

【0198】

CARBA P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、CARBA P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. 他（1999）Science 285:1569-1572）。

20

【0199】

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

30

【0200】

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CARBA Pまたはその断片、CARBA Pの抗体、CARBA P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。薬用有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手法によって、例えばED₅₀（集団の50%の医薬的有効量）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。毒性効果の治療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、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

40

【0201】

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、特定の薬剤の半減期及びクリアランス率によって3～4日毎に1度、1週間に1度、或いは2週間に1度の間隔で投与し得る

50

。

【0202】

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。

【0203】

(診断)

別の実施例では、CARBAPに特異的に結合する抗体が、CARBAPの発現によって特徴付けられる疾患の診断、またはCARBAPやCARBAP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。CARBAP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CARBAPを検出する方法が含まれる。抗体は、修飾して或いは修飾しないで使用し、レポーター分子の共有結合性或いは非共有結合性の接着によって標識化し得る。多様なレポーター分子が本技術分野で知られており、それらを用いることができる。幾つかのレポーター分子については上記した。

10

【0204】

CARBAP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CARBAP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CARBAP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CARBAP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、及び疾患生検組織からの各サンプルのCARBAP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。

20

【0205】

本発明の別の実施例によれば、CARBAP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。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNA及びDNA分子、そしてPNAが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と関連し得るCARBAP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、CARBAPの存在の有無、更に過剰な発現を調べ、治療中のCARBAP値の調節を監視する。

30

【0206】

一実施形態では、CARBAP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、CARBAP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CARBAP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を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。

40

【0207】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、CARBAP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: 3-4の配列、或いはCARBAP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。

50

【0208】

CARBA P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、CARBA P及びCARBA P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。

10

【0209】

CARBA Pをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、CARBA Pの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定されるものではないが、そのような疾患として、細胞増殖異常には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれ、自己免疫/炎症性疾患には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(APCED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、膵炎、多発性筋炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、強皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、生殖系疾患には、プロラクチン産生障害、不妊症(卵管疾患、排卵欠損症、子宮内膜症)、性周期障害、月経周期障害、多嚢胞性卵巣症候群、卵巣過刺激症候群、子宮内膜癌、卵巣癌、子宮筋腫、自己免疫疾患、子宮外妊娠、催奇形、乳がん、繊維嚢胞性乳房疾患、乳漏症、精子形成破壊、精子異常生理、精巣癌、前立腺癌、良性前立腺肥大、前立腺炎、パイロニー病、性交不能、男性乳癌、女性化乳房、高ゴナドトロピン性腺機能低下症、低ゴナドトロピン性腺機能低下症、偽性半陰陽、無精子症、早発性卵巣不全症、アクロシン欠乏症、思春期遅延、逆行性射精、無射精、および血管芽細胞腫、嚢胞褐色細胞腫(cystochromeocytomas)、傍神経節腫、副睾丸の嚢腺腫、および内リンパ嚢腫瘍が含まれ、神経系疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病(クールー、クロイツフェルトヤコブ病、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(cerebelloretinal 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

20

30

40

50

経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病（気分性、不安性の障害、分裂病性疾患）、季節性障害（SAD）、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、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健忘症とが含まれる。変異CARBAP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して、CARBAPをコードするポリヌクレオチド配列を、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、ディップステック（dipstick）、ピン（pin）、およびマルチフォーマットのELISA様アッセイ、及び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

【0210】

ある実施態様では、CARBAP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。CARBAP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CARBAP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。

20

【0211】

CARBAP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、CARBAP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。

30

【0212】

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

【0213】

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。

40

【0214】

CARBAP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、PCR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 *in vitro* で産出し得る。オリゴマーは、好ましくはCARBAPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはCARBAP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、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DNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いること

50

が可能である。

【0215】

或る実施態様において、CARBAP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、一塩基多型性(SNP)を検出し得る。SNP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SNPの検出方法には、SSCP(single-stranded conformation polymorphism)及び蛍光SSCP(fSSCP)がある。SSCPでは、CARBAP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(PCR)でDNAを増幅する。DNA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。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR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。fSSCP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DNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー(amplimer)の検出が可能になる。更に、インシリコSNP(in silico SNP, *in silico* SNP)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DNA断片の配列を比較することにより、多型性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA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MASSARRAYシステム(Sequenom, Inc., San Diego CA)を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0216】

CARBAPの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅(coamplification)、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる(例えば、Melby, P. C. 他(1993) J. Immunol. Methods, 159:235-44; Duplaa, C. 他(1993) Anal. Biochem. 229-236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。

【0217】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌク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、突然変異及び多型性の同定に用いることができる。この情報を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に効果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。

【0218】

別の実施例では、CARBAP、CARBAPの断片、CARBAP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。

【0219】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリ

ヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所与の条件下で所与の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る (Seilliamer 他、米国特許第 5,840,484 号「Comparative Gene Transcript Analysis」を参照)。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロフィールを提供し得る。

10

【0220】

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。

【0221】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロフィー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. 他 (1999) Mol. Carcinog. 24:153-159、Steiner, S. 及び 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。たとえ、発現が任意の試験された化合物によって変化しない遺伝子があったとしても、それらの発現レベルを残りの発現データを標準化するために使用できるため、それらの遺伝子は重要である。標準化手順は、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。毒性シグネチャのエレメントへの遺伝子機能を割り当てることは毒性機構の解明に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的な一致には遺伝子機能の知識は必要ではない (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。

20

30

【0222】

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、未処理生物学的サンプル中のレベルと比較する。両サンプルの転写レベルの差は、処理されたサンプル中で試験化合物が引き起こす毒性反応を示す。

40

【0223】

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

50

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ァイルは、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未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

【0224】

プロテオームのプロファイルは、CARBAPに特異的な抗体を用いてCARBAP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. 他(1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Mendozze, L.G. 他(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。

20

【0225】

プロテオームレベルでの毒性シグネチャも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性シグネチャと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので(Anderson, N.L. 及び 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ァイルを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。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ァイ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。

30

【0226】

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、未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。

40

【0227】

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、未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。

50

【0228】

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. 他 (1995) の米国特許第5,474,796号、Schena, M. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619、Baldeschweiler 他 (1995) PCT出願第WO95/251116号、Shalon, D. 他 (1995) PCT出願第WO95/35505号、Heller, R. A. 他 (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155、Heller, M. J. 他 (1997) 米国特許第5,605,662号等を参照)。様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, 編集。(1999) Oxford University Press, Londonに記載されている。該文献は、特に引用することを以って本明細書の一部となす。

【0229】

本発明の別の実施例ではまた、CARBAP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 (Harrington, J. J. 他 (1997) Nat Genet. 15:345-355、Price, C. M. (1993) Blood Rev. 7:127-134、Trask, B. J. (1991) Trends Genet. 7:149-154等を参照)。一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて、例えば病状の遺伝と特定の染色体領域やまたは制限酵素断片長多型 (RFLP) の遺伝とが相関するような遺伝子連鎖地図を作成可能である (Lander, E. S. 及び D. Botstein (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7353-7357を参照)。

【0230】

蛍光原位ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと相関し得る (Heinz-Ulrich, 他 (1995) 前出の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CARBAP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。

【0231】

確定した染色体マーカーを用いた連鎖分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、特定のヒト染色体の数或いはアームが分かっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて遺伝的疾患を調査する研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、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 (Gatti, R. A. 他 (1988) Nature 336:577-580等を参照)。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

10

20

30

40

50

【0232】

本発明の別の実施例では、CARBAP、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。CARBAP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。

【0233】

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処理能力でスクリーニングするために用いられる (Geysen, 他 (1984) PCT出願番号 WO84/03564等を参照)。この方法においては、多数の異なる小さな試験用化合物を固体基板上で合成する。試験用化合物は、CARBAP、或いはその断片と反応してから洗浄される。次に、本技術分野でよく知られている方法で、結合したCARBAPを検出する。精製したCARBAPはまた、上記した薬剤のスクリーニング技術において用いるプレート上で直接コーティングすることもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【0234】

別の実施例では、CARBAPと結合可能な中和抗体がCARBAP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、CARBAP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。

【0235】

別の実施例では、将来に開発される分子生物学技術で、現在知られているヌクレオチド配列の特性 (限定はされないが、トリプレット遺伝コード、特異的な塩基対相互作用等を含む) に依存しているならば、CARBAPをコードするヌクレオチド配列にその新技术を用い得る。

【0236】

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。

【0237】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/237,456号に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0238】

(実施例)

1 cDNAライブラリの作製

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

【0239】

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 (QI

10

20

30

40

50

AGEN)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。

【0240】

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。cDNAは好適なプラスミドのポリリンカーの適合する制限酵素部位でライゲーションされた。好適なプラスミドは、例えばPBLUESCRIPTプラスミド(Stratagene)、PSPORT1プラスミド(Life Technologies)PCDNA2.1プラスミド(Invitrogen, Carlsbad CA)、PBK-CMVプラスミド(Stratagene)、PCR2-TOPOTAプラスミド(Invitrogen)、PCMV-ICISプラスミド(Stratagene)、pIGEN(Incyte Genomics, Palo Alto CA)、またはpINCY(Incyte Genomics)、またはこれらの誘導体である。組換えプラスミドは、Stratagene社のXL1-Blue、XL1-BIueMRFまたはSOLR、或いはLife Technologies社のDH5、DH10BまたはELECTROMAX DH10Bを含む大腸菌細胞に形質転換した。

【0241】

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。プラスミドは、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。

【0242】

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FLUOROSKANI I蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0243】

3 シークエンシング及び分析

実施例2に記載したようにプラスミドから回収したIncyte cDNAを、以下に示

すようにシークエンシングした。cDNAのシークエンス反応は、標準的方法或いは高処理装置、例えばABI CATALYST 800 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) またはPTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research) をHYDRAマイクロディスペンサー (Robbins Scientific) またはMICROLAB 2200 (Hamilton) 液体転移システムと併用して処理した。cDNAのシークエンス反応は、Amersham Pharmacia Biotech社が提供する試薬、またはABIシークエンシングキット、例えばABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems) の試薬を用いて準備した。cDNAのシークエンス反応の電気泳動的分離及び標識したポリヌクレオチドの検出には、MEGABACE 1000 DNAシークエンシングシステム (Molecular Dynamics) か、標準ABIプロトコル及び塩基対呼び出しソフトウェアを用いるABI PRISM 373または377シークエンシングシステム (Applied Biosystems) か、或いはその他の本技術分野でよく知られている配列解析システムを用いた。cDNA配列内のリーディングフレームは、標準的方法 (前出のAusubel, 1997, 7.7ユニットに概説) 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。

【0244】

Incyteの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)配列の除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。その際、BLAST、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。IncyteのcDNA配列、またはその翻訳を公共のデータベース (例えばGenBankの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、BLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM) 及びPFAM等隠れマルコフモデル(HMM)ベースのタンパク質ファミリーデータベースに対して問い合わせた(HMMは、遺伝子ファミリーのコンセンサス1次構造を分析する確率的アプローチである。例えば、Eddy, S. R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365を参照)。問合せは、BLAST、FASTA、BLIMPS及びHMMERに基づくプログラムを用いて行った。Incyte cDNA配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築された。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)に基づいた、タンパク質ファミリーデータベースに対する問合せによって完全長ポリペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア (日立ソフトウェアエンジニアリング, South San Francisco CA) 及びLASERGENEソフトウェア (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マルチシークエ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作製する。

【0245】

Incyte cDNA及び完全長配列の分析及びアセンブリに利用したツール、プログ

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

【0246】

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: 3 - 4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

【0247】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上の糖結合タンパク質は、公共のゲノム配列データベース（例えば、gbpriやgbhtg）においてGenscan遺伝子同定プログラムを実行して初めに同定された。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. 及び S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268: 78 - 94、Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8: 346 - 354を参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから終止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列が糖結合タンパク質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モデルにおいて糖結合タンパク質について問合せて分析した。潜在的な糖結合タンパク質はまた、糖結合タンパク質として注釈が付けられていたIncyte cDNA配列への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genpept及びgbpriと比較した。必要であれば、genpeptからのトップのBLASTヒット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未編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

20

30

【0248】

5 cDNA配列データを使ったゲノム配列データの構築

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シング変異体を生み出した。区間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区間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つのゲノム配列にある区間が存在する場合、3つの

50

区間は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列を cDNA 配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列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区間と区間との連鎖 (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 *gbpri* 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* からのトップの BLAST ヒット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

【0249】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

部分 DNA 配列は、BLAST 分析に基づくアルゴリズムにより完全長まで伸長された。先ず、BLAST プログラムを用いて、GenBank の霊長類、げっ歯類、哺乳動物、脊椎動物及び真核生物のデータベースなどの公共データベースに対し、実施例 3 に記載されたように構築された部分 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

【0250】

6 CARBAP 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: 3 - 4 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: 3 - 4 と一致するこれらのデータベースの配列を、*Phrap* などの構築アルゴリズム (表 7) 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、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

30

【0251】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または区間として表される。センチモルガン区間の地図上の位置は、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

【0252】

7 ポリヌクレオチド発現の分析

50

ノーザン分析は、遺伝子の転写物の存在を検出するために用いられる実験用技術であり、特定の細胞種或いは組織からのRNAが結合されてい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を伴う（例えば、Sambrook, 前出, 7章; 及び Ausubel, F.M., 他, 前出, 4章及び16章を参照）。

【0253】

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、多数の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どうかを決定するため、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)

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

【0254】

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

【0255】

或いは、CARBAP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、膵臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの1つの生物/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/病状カテゴリー即ち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、鬱血、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、CARBAP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

【0256】

8 CARBAP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。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、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区間は全て回避した。

【0257】

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。

【0258】

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。反応混合液には、DNA鋳型、各プライマー200nmolと、 Mg^{2+} 、 $(NH_4)_2SO_4$ 及びβ-メルカプトエタノールを含む反応緩衝液と、Taq DNAポリメラーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)と、ELONGASE酵素(Life Technologies)と、Pfu DNAポリメラーゼ(Stratagene)が含まれていた。プライマー対PCI A、PCI Bに対して用いたパラメータは次の通りである。

ステップ1	94	で3分間	
ステップ2	94	で15秒間	20
ステップ3	60	で1分間	
ステップ4	68	で2分間	
ステップ5	ステップ2、3、及び4を20回繰り返す		
ステップ6	68	で5分間	
ステップ7	4	で保存	

別法では、プライマー対、T7とSK+に対して以下のパラメータで増幅を行った。

ステップ1	94	で3分間	
ステップ2	94	で15秒間	
ステップ3	57	で1分間	
ステップ4	68	で2分間	30
ステップ5	ステップ2、3、及び4を20回繰り返す		
ステップ6	68	で5分間	
ステップ7	4	で保存	

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5µlの希釈していないPCR産物に溶解した100µl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5~10µl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。

【0259】

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コラウイルスエンドヌクラーゼ(Molecular Biology Research, Madison WI)を用いて消化し、pUC18ベクター(Amersham Pharmacia Biotech)への再連結反応前に音波処理またはせん断した。シヨットガン・シークエンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度(0.6~0.8%)のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE(Promega)で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ(New England Bi 50

olabs, 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オーバーハングを満たし、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 / 2 X カルベニシリン培養液の 384 ウェルプレートに 37 で一晩培養した。

【0260】

細胞を溶解し、Taq DNA ポリメラーゼ (Amersham Pharmacia Biotech) 及び Pfu DNA ポリメラーゼ (Stratagene) を用いて PCR によって DNA を増幅した。その際用いたパラメータは次の通りである。

ステップ 1	94	で 3 分間
ステップ 2	94	で 15 秒間
ステップ 3	60	で 1 分間
ステップ 4	72	で 2 分間
ステップ 5	ステップ 2、3、及び 4 を 29 回繰り返す	
ステップ 6	72	で 5 分間
ステップ 7	4	で 保存

DNA は、上記の PICO GREEN 試薬 (Molecular Probes) によって定量した。DNA の回収率が低いサンプルは、上記と同一の条件を用いて再増幅した。サンプルは 20% ジメチルスルホキシド (1:2, v/v) で希釈し、DYENAMIC エネルギートランスファー シークエンシングプライマー、及び DYENAMIC DIRECT kit (Amersham Pharmacia Biotech) または ABI PRISM BIG DYE ターミネーターサイクル シークエンシング反応キット (Terminator cycle sequencing ready reaction kit) (Applied Biosystems) を用いてシークエンシングした。

【0261】

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。

【0262】

9 個々のハイブリダイゼーションプローブの標識及び使用

SEQ ID NO: 3 - 4 由来のハイブリダイゼーションプローブを用いて、cDNA、mRNA、またはゲノム DNA をスクリーニングする。約 20 塩基対からなるオリゴヌクレオチドの標識について特に記載するが、より大きなヌクレオチド断片に対しても事実上同一の手順が用いられる。オリゴヌクレオチドは、OLIGO 4.06 ソフトウェア (National Biosciences) 等の最新ソフトウェアを用いて設計し、各オリゴマー 50 pmol と、[³²P] アデノシン 3 リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 µCi と、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25 超細繊維分子サイズ排除デキストランビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて十分に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba I または Pvu II (DuPont NEN) のいずれか 1 つのエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノム DNA の典型的な膜ベースのハイブリダイゼーション解析において、毎分 10⁷ カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【0263】

各消化物から得た DNA は、0.7% アガロースゲル上で分画してナイロン膜 (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH) に移す。ハイブリダイゼーションは、40 で 16 時間行う。非特異的シグナルを除去するため、例えば 0.1 x 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

10

20

30

40

50

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。

【0264】

10 マイクロアレイ

マイクロアレイの表面上でアレイエレメントの結合または合成は、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Bal des chweiler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板は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである（S ch e n a (1 9 9 9) 前出）。推奨する基板には、シリコン、シリカ、スライドガラス、ガラスチップ及びシリコンウエハがある。或いは、ドットプロット法またはスロットプロット法に類似のアレイを利用して、熱的、紫外線的、化学的または機械的結合手順を用いて基板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 c h e n a , M . 他 (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 . 他 (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）。

10

【0265】

完全長cDNA、発現配列タグ（EST）、またはその断片またはオリゴマーは、マイクロアレイのエレメントと成り得る。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GENEソフトウェア（DNASTAR）等の本技術分野で公知のソフトウェアを用いて選択することが可能である。アレイエレメントは、生物学的サンプル中でポリヌクレオチドを用いてハイブリダイズされる。生物学的サンプル中のポリヌクレオチドは、検出を容易にするために蛍光標識またはその他の分子タグに抱合される。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、レーザ脱離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。

20

30

【0266】

組織または細胞サンプルの準備

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全RNAを単離し、オリゴ（dT）セルロース法を用いてポリ（A）⁺ RNAを精製する。各ポリ（A）⁺ RNAサンプルを、MMLV逆転写酵素、0.05 pg / μlのオリゴ（dT）プライマー（21mer）、1×第一鎖合成バッファー、0.03 unit / μlのRNアーゼ阻害因子、500 μMのdATP、500 μMのdGTP、500 μMのdTTP、40 μMのdCTP、40 μMのdCTP - Cy3（BDS）またはdCTP - Cy5（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて逆転写する。逆転写反応は、GEMBRIGHTキット（Incyte）を用いて、200 ngのポリ（A）⁺ RNAを含む25 ml容量で行う。特異的対照ポリ（A）⁺ RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから*in vitro*転写により合成する。各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 °Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMASPIN 30ゲル濾過スピカラム（CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA）を用いて精製する。混合後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン（1 mg / ml）、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールを用いてエタノール析出させる。サンプルは次に、SpeedVAC（Savant Instruments Inc., Ho

40

50

l b r o o k N Y) を用いて乾燥して仕上げ、 $14 \mu\text{l}$ $5 \times \text{SSC} / 0.2\% \text{SDS}$ 中で再懸濁する。

【0267】

マイクロアレイの準備

本発明の配列を用いて、アレイエレメントを作製する。各アレイエレメントは、クローン化 cDNA インサートによりベクター含有細菌性細胞から増幅する。PCR 増幅は、cDNA インサートの側面に位置するベクター配列に相補的なプライマーを用いる。30 サイクルの PCR によって、 $1 \sim 2 \text{ ng}$ の初期量から $5 \mu\text{g}$ を超える最終量までアレイエレメントを増幅する。増幅されたアレイエレメントは、SEPHACRYL - 400 (Ame 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。

10

【0268】

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 (C o r n i n g) 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処理をかけ、蒸留水で非常に良く洗浄する。スライドガラスは、 4% フッ化水素酸 (VWR S c i e n t i f i c P r o d u c t s C o r p o r a t i o n (V W R) , W e s t C h e s t e r P A) 中でエッチングし、蒸留水中で非常に良く洗浄し、 95% エタノール中で 0.05% アミノプロピルシラン (S i g m a) を用いてコーティングする。コーティングしたスライドガラスは、 110°C の天火で硬化させる。

【0269】

米国特許第 5,807,522 号で説明されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。該特許は、引用を以って本明細書の一部となす。平均濃度が $100 \text{ ng} / \mu\text{l}$ のアレイエレメント DNA $1 \mu\text{l}$ を高速ロボット装置により開口キャピラリープリントエレメントに充填する。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。

20

【0270】

マイクロアレイには、STRATALINKER UV 架橋剤 (S t r a t a g e n e) 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 (P B S) (T r o p i x , I n c . , B e d f o r d M A) 中の 0.2% カゼイン中において 60°C で 30 分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように 0.2% SDS 及び蒸留水で洗浄すること

30

【0271】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、 $5 \times \text{SSC}$ 、 0.2% SDS ハイブリダイゼーション緩衝液に Cy 3 及び Cy 5 標識した cDNA 合成産物を各 $0.2 \mu\text{g}$ 含む $9 \mu\text{l}$ のサンプル混合体を含めたものである。サンプル混合体は、 65°C まで 5 分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して 1.8 cm^2 のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡用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 $140 \mu\text{l}$ の $5 \times \text{SSC}$ を加えることにより、チェンバー内部を湿度 100% に保持する。アレイを含むチェンバーは、 60°C で約 6.5 時間インキュベートする。アレイは、第 1 洗浄緩衝液中 ($1 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS) において 45°C で 10 分間洗浄し、第 2 洗浄緩衝液中 ($0.1 \times \text{SSC}$) において 45°C で 10 分間各々 3 度洗浄して乾燥させる。

40

【0272】

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Cy 3 の励起のためには 488 nm 、Cy 5 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 (C o h e r e n t , I n c . , S a n t a C l a r a C A) を備えた顕微鏡で検出する。 $20 \times$ 顕微鏡対物レンズ (N i k o n , I n c . , M e l v i l l e N Y) 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

50

キャンする。本実施例で用いた $1.8 \text{ cm} \times 1.8 \text{ cm}$ のアレイは、 $20 \mu\text{m}$ の解像度でスキャンした。

【0273】

2つの異なるスキャンで、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565nm、Cy5では650nmである。装置は両方の蛍光色素からのスペクトルを同時に記録し得るが、レーザ源において好適なフィルターを用いて、
10 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。

【0274】

スキャンの感度は通常、既知濃度でサンプル混合体に添加されるcDNA対照種により発生されるシグナル強度を用いて校正する。アレイ上の特定の位置には相補的DNA配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度を重量比1:100,000でハイブリダイゼーション種と相関させる。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、2つの蛍光色素で校正するcDNAのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって
20 校正を行う。

【0275】

光電子増倍管の出力は、IBMコンパチブルPCコンピュータにインストールされた12ビットRTI-835Hアナログデジタル(A/D)変換ボード(Analog Devices, Inc., Norwood MA)を用いてデジタル化される。デジタル化されたデータは、青色(低シグナル)から赤色(高シグナル)までの擬似カラー範囲へのリニア20色変換を用いてシグナル強度がマッピングされたようなイメージとして表示される。データは、定量的にも分析される。2つの異なる蛍光色素を同時に励起および測定する場合には、各蛍光体の発光スペクトルを用いて、データはま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起因する)を補正する。
30

【0276】

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。
30

【0277】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

CARBAP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CARBAP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
40 (National Biosciences)及びCARBAP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CARBAPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0278】

1.2 CARBAPの発現

CARBAP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CARBAP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をサブクローニング
50

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-Dチオガラクトピラノシド (IPTG) で誘発されると CARBAP を発現する。真核細胞での CARBAP 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、CARBAP 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. 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-3227, Sandig, V. 他 (1996) Hum. Gene Ther. 7: 1937-1945. 等を参照)。

【0279】

殆どの発現系では、CARBAP 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 CARBAP 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 CARBAP を直接用いて以下の実施例 16、17、18、および 19 のアッセイを行うことができる。

【0280】

1.3 機能的アッセイ

CARBAP 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 CARBAP をコードする配列の発現によって評価する。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 cDNA をサブクローニングする。選択されるベクターには、pCMV SPORT プラスミド (Life Technologies) 及び pCR3.1 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過的に形質移入する。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、形質移入された細胞と形質移入されていない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、前方散乱光と90°側方散乱光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。

【0281】

遺伝子発現におけるCARBAPの影響は、CARBAPをコードする配列とCD64またはCD64-GFP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。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64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(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNA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。CARBAP及び目的の他の遺伝子をコードするmRNA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。

10

【0282】

1.4 CARBAPに特異的な抗体の作製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE; 例えば, Harrington, M. G. (1990) Methods Enzymol. 1816-3088-495を参照)または他の精製技術で実質的に精製されたCARBAP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。

20

【0283】

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

【0284】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によってKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫原性を高める(前出のAusubel, 1995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-KLH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CARBAP活性を検査するには、ペプチドまたはCARBAPを基板に結合し、1%BSA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IgGと反応させる。

30

【0285】

1.5 特異的な抗体を用いる天然CARBAPの精製

天然CARBAP或いは組換えCARBAPを、CARBAP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、CNBr-活性化SEPHAROSE(Amersham Pharmacia Biotech)のような活性化クロマトグラフィー用レジンと抗CARBAP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。

40

【0286】

CARBAPを含む培養液をイムノアフィニティークラムに通し、CARBAP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

50

) そのカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とCARBAPとの結合を切るような条件で(例えば、pH 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イオンで)溶出させ、CARBAPを回収する。

【0287】

16 CARBAPと相互作用する分子の同定

CARBAPまたは生物学的に活性なその断片を、¹²⁵I ボルトンハンター試薬で標識する(例えば、Bolton A. E. 及びW. M. Hunter (1973) Biochem. J. 133:529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CARBAPと共にインキュベートし、洗浄して、標識したCARBAP複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なCARBAP濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したCARBAPの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【0288】

別法では、CARBAP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。

【0289】

CARBAPはまた、高処理型の酵母2ハイブリッドシステムを使用するPATHCAL LING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)。

【0290】

17 CARBAP活性の実証

CARBAP活性は、ガラクトシド糖に結合する能力として実証される。CARBAPがラクトシルセファロースカラムにかけられ、そのカラムを0.1Mのラクトースで溶出する。溶出液中のCARBAPの存在は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出され、CARBAPのガラクトシド糖への結合能力を示す。

【0291】

CARBAPの別のアッセイは、HAを加水分解する能力として実証される(前記のLepperdinger)。放射能標識されたHAを、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとN-ヒドロキシサルフォサクシンイミドを使って、微量定量プレートに固定化する。CARBAPとインキュベーションした後の溶化した放射能が液体シンチレーションカウンターを使って測定され、その放射能は開始サンプルのCARBAPと比例する。

【0292】

別法では、CARBAP活性は、NIH3T3マウス線維芽細胞の形質転換を調節する能力によって測定される。CARBAPをコードするcDNAは好適な真核生物発現ベクターにサブクローンされる。当分野で周知の方法を用いて、NIH3T3細胞にこの構成物を形質移入する。以下の発癌的に形質転換された細胞に特徴的な定量化可能な特性に関して、形質移入された細胞を移入されなかった細胞と比較する: 接触障害の欠如に関連した高密度に至る培養の成長、溶液中またはソフトアガーでの成長、血清要求性の低下、および免疫不全マウスに注射された時に腫瘍を起こす能力。CARBAPの活性は、CARBAPで形質移入されたNIH3T3細胞と非形質移入細胞の形質転換の程度に比例する。

【0293】

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、

10

20

30

40

50

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。

【0294】

(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。

【0295】

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。

10

【0296】

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。

【0297】

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やゲノム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。

【0298】

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。

【0299】

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。

20

【0300】

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

【表1】

表 1

Incyte プロジェクト ID	ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	ポリスクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリスクレオチド ID
2197815	1	2197815CD1	3	2197815CB1
2369534	2	2369534CD1	4	2369534CB1

10

20

30

【表 2】

表 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	融解スコア	GenBank 相同体
1	2197815CD1	G11275988	0	[ヒト] 精巣発達タンパク質 PRID
2	2369634CD1	G2950243	4.10E+14	[オオムギ] エクステンシン

10

20

30

【表 3】

表 3

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	2197815CD1	878	S13 S26 S53 S70 S149 S289 S364 S448 S454 S540 S615 S626 S641 S675 S731 S736 S756 S871 T63 T112 T198 T217 T224 T288 T473 T575 T614 T671 T838 S74 S152 T145	N128 N315	線虫 cDNA によってコードされる YK66D12.3: PD148401: M328-Q552, I192-K219	BLAST-PRODOM
2	2369534CD1	156		N135	タンパク質 反復 シグナル 前駆体 プリオン 糖 タンパク 核 GPI アンカー 膜 主要 PD001091: A2-S152	BLAST-PRODOM

【表 4】

10

20

30

表 4

ポリスクレオサド SEQ ID NO:	Incyte ポリスクレオサド ID	配列長	選択断片	配列断片	5'位置	3'位置
3	2197815CB1	4836	1-1899, 4736-4836, 1034-1103, 1-549, 2970-3390, 3775-3817, 4595-4836, 1598-1787	7647274JI (UTRSTUE01)	586	1235
				3450255TG (BRACNOK03)	2397	3086
				7050545H1 (BRACNOK02)	2144	2852
				1910455F6 (CONNTUT01)	4359	4836
				1968123R6 (BRSTN0T04)	3777	4309
				4523354F6 (HNT2TXIT01)	550	1051
				70851245V1	3400	4260
				70853740V1	1168	1760
				7168435H1 (MCLRNOC01)	1	585
				6492770H1 (MIXDUNE01)	1710	2352
				6867810H1 (BRAGNON02)	2859	3507
				1795917R6 (PROSTUT05)	4139	4616
				7163777H1 (PLACNOR01)	1288	1900
				2997273H1 (OVARTUT07)	1893	2154
4	2369534CB1	3239	1-51, 1855-2812, 2546-3239, 1-41, 804-1942	7664922H1 (UTRSTME01)	2678	3239
				2942126H2 (CONNTUT05)	2159	2412
				91698302	1	525
				7336360H1 (CONFIDN02)	253	795
				6913630J1 (PITUDIR01)	1270	1858
				1399190H1 (BRAITUT08)	21	266
				70452972V1	171	791
				7241031H1 (PROSTMV01)	807	1409
				7159840H1 (HNT2TXC01)	1533	2038
				7764247H1 (URETTUE01)	565	1189
				7604102J1 (ESOGTME01)	2230	2865

【表 5】

表 5

ポリアスクレオチド	Insite	代表的ライブラリ
SEQ ID NO: 3	プロシエント ID 2197815CB1	BRACNOK02
4	2369534CB1	ADRETTU06

10

20

30

【表 6】

表 6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
ADRETUT06	P-LINCY	ライブラリは 57 才の白人女性の片側性右側副腎摘除時に採取した副腎腫瘍組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査は、クロム親和性細胞腫を示し、それが副腎の髄質を完全に置き換えた結節性塊を形成していた。
BRACNOK02	PSPORT1	この増幅され規格化されたライブラリは、心筋梗塞と後腹膜出血で死亡した 85 歳になる白人女性から採取した後帯状組織の分離 RNA を使用して構築された。病理学検査では、中程度から重症のアテローム性動脈硬化を示し、それがウイリス環、中大脳、脂底動脈と椎骨動脈を含み、また梗塞 (遠因、左側、齒状核) を示し、年齢に一致したアミロイド斑の沈着が見られた。軽度から中程度の軟膜線維症があり、特に前頭葉の凸面に見られた。全ての頭葉を含む全体的な軽度の萎縮があった。大脳の白質は、軽度から希薄化していた。側頭葉にある皮質の厚さの最大と最小は共にわずかに縮小していた。黒質緻密部は少し白くなっていた。患者の病歴には、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、高血圧および再発性深部脳血管検査があった。この増幅したライブラリから分離した 640 万個のクローンは、Soares 他および Bonaldo 他 (1996) 6:791、9232 および Bonaldo 他、Genome Research (1996) 6:791) で規格化された。(Soares 他, PNAS (1994) 91:9228)

【表 7】

10

20

30

【表 8】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関値
ABI FACTURA	ベクター配列を除き、核酸配列のままわらわしい塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	アミノ酸または核酸配列の比較、注釈に有用なファーストデータファインダ。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI AutoAssembler	核酸配列の構築を行うプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	アミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用なベージングローカルアライメント検索ツール (Basic Local Alignment Search Tool)。Blastにはblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxの5つの機能がある。	Aitschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	EST: 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値1.0E-10 以下
FASTA	一群の同じタイプの配列と問合せ配列との間の類似性について検索するPearson およびLipman アルゴリズム。FASTAには最小5つの機能(fasta、tblasta、fastx、tfastx、およびsearch)がある。	Pearson, W. R. および 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.	EST: fasta E 値=1.0E-6 構築されたEST: fasta 同一性=95%以上 一致した長さ=200塩基以上 fasta 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グアブプリント領域を検索するBLOCKS IMPROVED Searcher	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. 266:88-105; Attwood, T. K. 他 (1987) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値=1.0E-3 以下
HMMER	問合せ配列をPFAMのようなタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他 (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Southamper, E. L. L. 他 (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. 他 (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, 1-350ページ	PFAM ヒット: 確率値 = 1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット: スコア = 0 以上

10

20

30

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関値
ProfileScan	Prostie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探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	標準化された質スコア≧特定のProstieモチーフに対するGCC指定「HIGH」値 通常、スコア=1.4~2.1.
Phred	高度感受性および確立性のある自動シーケンサートレースを調べる塩基コーリングアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. および P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的実行に基づいたプログラムである、SWATとCrossMatchを含むPhils改訂構築プログラムで、配列相同性検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. 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; Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap 構築の表示、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ヤンし、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重量マトリックス分析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. および S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=0.5以上
TMAP	重量マトリックスを使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、方向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argus (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argus (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TIMBLER	隠れMarkov モデル(HMM)を使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、方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, 編集, The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, 175-182ページ	
Motifs	Prostieで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, バージョン9, M61-59ページ, Genetics Computer Group, Madison, WI	

【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
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/29055 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C07K 16/18, C12Q 1/68, A61K 38/16, 39/395, G01N 33/50, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US01/30591
- (22) International Filing Date: 1 October 2001 (01.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/237,456 2 October 2000 (02.10.2000) 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): TANG, Y., Tom [US/US]; 4230 Ramwick Court, San Jose, CA 95118 (US); ELLIOTT, Vicki, S. [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US); YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US); LAL, Preeti [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US); WALIA, Narinder, K. [US/US]; 890 David Street, #205, San Leandro, CA 94577 (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, EC, 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, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, 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 02/29055 A2

(54) Title: CARBOHYDRATE-ASSOCIATED PROTEINS

(57) Abstract: The invention provides human carbohydrate-associated proteins (CARBAP) and polynucleotides which identify and encode CARBAP. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides method for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of CARBAP.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

CARBOHYDRATE-ASSOCIATED PROTEINS**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of carbohydrate-associated proteins and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of cell proliferative, autoimmune/inflammatory, reproductive, and neurological disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of carbohydrate-associated proteins.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Proteins are associated with carbohydrates in several ways. Glycoproteins have covalently attached carbohydrates which have been added to the proteins as they traverse the secretory pathway. Some proteins noncovalently associate with carbohydrate-containing macromolecules for purposes of binding, modifying, or degrading the carbohydrates. Carbohydrate-containing macromolecules, which include glycoproteins, glycolipids, glycosaminoglycans, and proteoglycans, are found on the cell surface and in the extracellular matrix. Glycosaminoglycans (GAGs) are linear unbranched polysaccharides composed of repetitive disaccharide units. GAGs exist free or as part of proteoglycans, large molecules composed of a core protein attached to one or more GAGs. (See Lodish, H. et al. (1995) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York NY, pp. 1136-1142.)

Cell surface carbohydrate-containing macromolecules, including glycoproteins, glycolipids, and transmembrane proteoglycans, mediate adhesion with other cells and with components of the extracellular matrix. The extracellular matrix is comprised of diverse glycoproteins, GAGs, and carbohydrate-binding proteins which are secreted from the cell and assembled into an organized meshwork in close association with the cell surface. The interaction of the cell with the surrounding matrix profoundly influences cell shape, strength, flexibility, motility, and adhesion. These dynamic properties are intimately associated with signal transduction pathways controlling cell proliferation and differentiation, tissue construction, and embryonic development.

The GAG hyaluronan (HA) is found in the extracellular matrix of many cells, especially in soft connective tissues, and is abundant in synovial fluid (Pitsillides, A.A. et al. (1993) *Int. J. Exp. Pathol.* 74:27-34). HA seems to play important roles in cell regulation, development, and differentiation (Laurent, T.C. and J.R. Fraser (1992) *FASEB J.* 6:2397-2404). HA functions in water and plasma protein homeostasis (Laurent, *supra*). HA may play a role in mitosis as its production increases in proliferating cells. HA is known to induce tumor cell adhesion and migration, and its small fragments are angiogenic. HA has been chemically modified as a biomaterial for medical

WO 02/29055

PCT/US01/30591

applications such as controlled drug release matrices, nerve guides, and wound dressings (Zhong, S.P. et al. (1994) *Biomaterials* 15:359-365). HA's tissue protective and rheological properties have proved useful in ophthalmic surgery. Serum HA is diagnostic of liver disease and various inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis. Interstitial edema caused by accumulation of HA may cause dysfunction in various organs (Laurent, *supra*).

Hyaluronidase is an enzyme that degrades HA to oligosaccharides by catalyzing the random hydrolysis of 1,4-linkages between N-acetyl-beta-D-glucosamine and D-glucuronate residues. Hyaluronidases have been found in organisms as diverse as bacteria, insects, reptiles, and mammals, and may function in cell adhesion, infection, angiogenesis, and signal transduction.

PH-20, a protein expressed in the mammalian testis and present on the plasma membrane of mouse and human sperm, has hyaluronidase activity (Lin, Y. et al. (1994) *J. Cell Biol.* 125:1157-1163). PH-20 enables sperm to penetrate the mammalian egg's outer layer, which consists of about 3,000 cumulus cells embedded in an extracellular matrix rich in HA. Penetration of this layer is an essential step in the fertilization process. PH-20 is also expressed in some tumor cells. Non-testicular mammalian hyaluronidases also exist. The HYAL1 hyaluronidase is expressed in human serum while the lysosomal hyaluronidase HYAL2 is expressed in many cells (Lepperdinger, G. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:22466-22470). HYAL2 may have a role in producing distinct HA fragments that can induce angiogenesis and the expression of enzymes involved in signal transduction pathways, such as nitric oxide synthase. A lysosomal-type hyaluronidase may degrade HA in lung fibroblasts in a cytokine-regulated process (Sampson, P.M. et al. (1992) *J. Clin. Invest.* 90:1492-1503).

The venom of numerous animals including various snakes, bees, hornets, stone fish, platypus, scorpions, and lizards contain hyaluronidase. Hyaluronidase from the white face hornet is an allergen which induces an IgE response in susceptible people (Lu, G. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:4457-4465). Venom hyaluronidase is thought to act as a "spreading factor", an aid in the diffusion of toxins. Researchers have found that lizard venom hyaluronidase promotes the spread of the hemorrhagic area in mice injected with hemorrhagic toxin (Tu, A.T. and R.R. Herndon (1983) *Comp. Biochem. Physiol. B* 76:377-383). Clostridium perfringens hyaluronidase is important for the pathogenicity of this bacterium, which causes food poisoning and gas gangrene (Canard, B. et al. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 243:215-224). The hyaluronidase destroys connective tissue in the host, allowing Clostridium perfringens to spread from the initial site of infection and to colonize and attack surrounding tissue.

Hyaluronidases are associated with reproduction, cancer, and inflammation. Effective contraception (100%) was obtained in male and female guinea pigs immunized with PH-20 (Primakoff, P. et al. (1988) *Nature* 335:543-546). Based on these results researchers are continuing

WO 02/29055

PCT/US01/30591

efforts to make an anti-sperm PH-20 contraceptive vaccine suitable for humans (Zhu, X. and R.K. Nak (1994) *Arch. Androl.* 33:141-144). Hyaluronidase activity is significantly elevated in prostate tumor tissue compared to that in both normal prostate and benign prostate hyperplasia (Lokeshwar, V.B. et al. (1996) *Cancer Res.* 56:651-657). Furthermore, hyaluronidase levels in tissues correlate well with tumor progression. The combined therapy of hyaluronidase, vindesine, cisplatin, and radiation is highly effective against advanced squamous cell cancer of the head and neck and is well tolerated by most human patients (Klocker, J. et al. (1995) *Am. J. Clin. Oncol.* 18:425-428). Hyaluronidase in combination with the chemotherapeutic drug vinblastine had significant antitumor effects on SK-Mel-3 melanoma cells implanted in nude mice (Spruss, T. et al. (1995) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121:193-202). Furthermore, hyaluronidase was well tolerated in test animals and prevented the local inflammation reactions that are commonly seen after subcutaneous vinblastine injections.

Lectins comprise a ubiquitous family of extracellular glycoproteins which bind cell surface carbohydrates specifically and reversibly, resulting in the agglutination of cells. (Reviewed in Drickamer, K. and M.E. Taylor (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* 9:237-264.) This function is particularly important for activation of the immune response. Lectins mediate the agglutination and mitogenic stimulation of lymphocytes at sites of inflammation (Lasky, L.A. (1991) *J. Cell. Biochem.* 45:139-146; Paietta, E. et al. (1989) *J. Immunol.* 143:2850-2857).

Lectins are further classified into subfamilies based on carbohydrate-binding specificity. The galectin subfamily, in particular, includes lectins that bind β -galactoside carbohydrate moieties in a thiol-dependent manner. (Reviewed in Hadari, Y.R. et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:3447-3453.) Galectins are widely expressed and developmentally regulated. Because all galectins lack an N-terminal signal peptide, it is suggested that galectins are externalized through an atypical secretory mechanism. Two classes of galectins have been defined based on molecular weight and oligomerization properties. Small galectins form homodimers and are about 14 to 16 kilodaltons in mass, while large galectins are monomeric and about 29-37 kilodaltons. Galectins contain a characteristic carbohydrate recognition domain (CRD), also known as a galactin domain. The CRD is about 140 amino acids long and contains several conserved residues. Secondary structure predictions indicate that the CRD forms several β -sheets. Known galectins contain one or two CRDs. (See Prosite PDOC00279 Vertebrate galactoside-binding lectin signature.)

Galectins play a number of roles in diseases and conditions associated with cell-cell and cell-matrix interactions. For example, certain galectins associate with sites of inflammation and bind to cell surface immunoglobulin B molecules. In addition, galectins may play an important role in cancer metastasis. Galectin overexpression is correlated with the metastatic potential of cancers in humans and mice. Moreover, anti-galectin antibodies inhibit processes associated with cell transformation,

WO 02/29055

PCT/US01/30591

such as cell aggregation and anchorage-independent growth.

Galectin-8, also known as prostate carcinoma tumor antigen 1 (PCTA-1), is a novel galectin implicated in cancer progression (Su, Z.-Z. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7252-7257). Galectin-8 was initially identified as the cell surface antigen recognized by a prostate tumor-directed monoclonal antibody, Pro 1.5. The galectin-8 gene encodes a 317-amino acid protein which contains two CRDs. Galectin-8 is expressed in invasive prostate carcinomas and early-stage prostate cancers, but not in normal prostate or benign prostatic hypertrophic tissue. In addition, galectin-8 is shed from the surface of cultured prostate cancer cells into the growth media. Together, these results suggest that detection of galectin-8 may be useful for early diagnosis of prostate cancer and that levels of galectin-8 in the circulation may correlate with disease progression. In addition, preliminary studies in mice suggest that the monoclonal antibody Pro 1.5 may itself be an effective therapeutic agent against tumor progression.

Mucins are highly glycosylated glycoproteins that are the major structural component of the mucus gel. The physiological functions of mucins are cytoprotection, mechanical protection, maintenance of viscosity in secretions, and cellular recognition. There are two types of mucins, secreted and membrane bound. Some of the secreted mucins are gel-forming due to their polymeric nature. The major mucin of the gastrointestinal tract is called MUC2 and is produced by the intestinal goblet cells. This mucin has properties that is different from other mucins, in that it can form insoluble mucus gels. MUC6 is a human gastric mucin that is also found in gall bladder, pancreas, seminal vesicles, and female reproductive tract (Toribara, N.W. et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:16398-16403). The MUC6 gene has been mapped to human chromosome 11 (Toribara, N.W. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:5879-5885). Mucins have been shown to be involved in cystic fibrosis and colon cancer development (Davril, M. (1999) Glycobiology 9:311-321; Lindhorst, E. (2000) Tumour Biol. 21:116-122).

Extensins are hydroxyproline-rich glycoproteins (HRGPs). HRGPs have been shown to play important structural and developmental roles (Hay, E.D. (1991) Cell Biology of Extracellular Matrix, ed. Hay, E.D., Plenum, New York NY, pp. 419-456). Extensins are one of the major components of the primary wall, though their varied distribution suggests a more tissue-specific function. Extensins are characterized by a repeating motif consisting of a serine residue followed by four hydroxyproline residues (Varner, J.E. and L.S. Lin (1989) Cell 56:231-239). The insolubilization of extensins, which involves H₂O₂-mediated oxidative cross-linking, is catalyzed by coexisting peroxidases and is induced by microbial challenge, injury or other forms of stress (Cooper, J.B. and J.E. Varner (1984) Plant Physiol. 76: 414-417).

The discovery of new carbohydrate-associated proteins, and the polynucleotides encoding them, satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis,

WO 02/29055

PCT/US01/30591

prevention, and treatment of cell proliferative, autoimmune/inflammatory, reproductive, and neurological disorders, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of carbohydrate-associated proteins.

5

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, carbohydrate-associated proteins, referred to collectively as "CARBAP" and individually as "CARBAP-1," and "CARBAP-2." 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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-2.

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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4.

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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. 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.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. 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.

Additionally, the invention provides an isolated antibody which 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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.

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:3-4, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, 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:3-4, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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, 5 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:3-4, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary 10 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) 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 15 polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an 20 immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and a pharmaceutically acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional CARBAP, comprising administering to a patient in need of such 25 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:1-2, b) a polypeptide comprising a 30 naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. 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 35 invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a

WO 02/29055

PCT/US01/30591

pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional CARBAP, 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
5 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:1-2, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2,
10 and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. The method comprises a) exposing a sample comprising the 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
15 treating a disease or condition associated with overexpression of functional CARBAP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, b) a polypeptide comprising a
20 naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one
25 test compound under suitable conditions, and b) detecting binding of the polypeptide to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide.

The invention further provides a method of screening for a compound that modulates the activity of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, b) a polypeptide comprising a
30 naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2. The method comprises a) combining the polypeptide with at least one
35 test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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.

5 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 polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, the method comprising a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, and b) detecting altered expression of the target polynucleotide.

10 The invention further provides 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 selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, ii) a
15 polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, 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
20 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:3-4, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, iii) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide
25 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
30 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.

35 Table 2 shows the GenBank identification number and annotation of the nearest GenBank

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 the polypeptides.

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

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

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.

15

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.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

DEFINITIONS

"CARBAP" refers to the amino acid sequences of substantially purified CARBAP 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.

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

10 An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding CARBAP. Allelic variants may result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and may result in altered mRNAs or in 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
15 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 CARBAP include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as CARBAP or a polypeptide with at least one functional characteristic of CARBAP. Included within this
20 definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of the polynucleotide encoding CARBAP, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding CARBAP. The encoded protein may also be "altered," and may contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change
25 and result in a functionally equivalent CARBAP. 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 CARBAP 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
30 polar side chains having similar hydrophilicity values may include: asparagine and glutamine; and serine and threonine. Amino acids with uncharged side chains having similar hydrophilicity values may include: leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; and phenylalanine and tyrosine.

The terms "amino acid" and "amino acid sequence" refer to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, or a fragment of any of these, and to naturally occurring or synthetic
35 molecules. Where "amino acid sequence" is recited to refer to a sequence of a naturally occurring

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of CARBAP either by directly interacting with CARBAP or by acting on components of the biological pathway in which CARBAP participates.

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 CARBAP 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 "aptamer" refers to a nucleic acid or oligonucleotide molecule that binds to a specific molecular target. Aptamers are derived from an *in vitro* evolutionary process (e.g., SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment), described in U.S. Patent No. 5,270,163), which selects for target-specific aptamer sequences from large combinatorial libraries. Aptamer compositions may be double-stranded or single-stranded, and may include deoxyribonucleotides, ribonucleotides, nucleotide derivatives, or other nucleotide-like molecules. The nucleotide components of an aptamer may have modified sugar groups (e.g., the 2'-OH group of a ribonucleotide may be replaced by 2'-F or 2'-NH₂), which may improve a desired property, e.g., resistance to nucleases or longer lifetime in blood. Aptamers may be conjugated to other molecules, e.g., a high molecular weight carrier to slow clearance of the aptamer from the circulatory system.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Aptamers may be specifically cross-linked to their cognate ligands, e.g., by photo-activation of a cross-linker. (See, e.g., Brody, E.N. and L. Gold (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13.)

The term "intramer" refers to an aptamer which is expressed in vivo. For example, a vaccinia virus-based RNA expression system has been used to express specific RNA aptamers at high levels in the cytoplasm of leukocytes (Blind, M. et al. (1999) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96:3606-3610).

The term "spiegelmer" refers to an aptamer which includes L-DNA, L-RNA, or other left-handed nucleotide derivatives or nucleotide-like molecules. Aptamers containing left-handed nucleotides are resistant to degradation by naturally occurring enzymes, which normally act on substrates containing right-handed nucleotides.

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 CARBAP, 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 amino acid sequence. The composition may comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequences encoding CARBAP or fragments of CARBAP may be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be associated with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be deployed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents (e.g., sodium dodecyl

WO 02/29055

PCT/US01/30591

sulfate; SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

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

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

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

35 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, (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.

40 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 function of the polypeptide from which it was derived.

5 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 comparisons may be carried out between, for example, a treated and an untreated sample, or a
10 diseased and a normal sample.

"Exon shuffling" refers to the recombination of different coding regions (exons). Since an exon may represent a structural or functional domain of the encoded protein, new proteins may be assembled through the novel reassortment of stable substructures, thus allowing acceleration of the evolution of new protein functions.

15 A "fragment" is a unique portion of CARBAP or the polynucleotide encoding CARBAP 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 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
20 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 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
25 by the specification, including the Sequence Listing, tables, and figures, may be encompassed by the present embodiments.

A fragment of SEQ ID NO:3-4 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:3-4, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:3-4 is useful, for
30 example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:3-4 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:3-4 and the region of SEQ ID NO:3-4 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-2 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:3-4. A fragment of
35 SEQ ID NO:1-2 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID

WO 02/29055

PCT/US01/30591

NO:1-2. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-2 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-2. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-2 and the region of SEQ ID NO:1-2 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the
5 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
10 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
15 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
20 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
25 <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 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/gorf/bl2.html>. The "BLAST 2 Sequences" tool can be used for both blastn and blastp (discussed below). BLAST
30 programs are commonly used with gap and other parameters set to default settings. For example, to

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

5 *Penalty for mismatch: -2*

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

10 *Filter: on*

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

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

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

Percent identity between polypeptide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e
30 sequence alignment program (described and referenced above). For pairwise alignments of polypeptide sequences using CLUSTAL V, the default parameters are set as follows: Ktuple=1, gap penalty=3, window=5, and "diagonals saved"=5. The PAM250 matrix is selected as the default residue weight table. As with polynucleotide alignments, the percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polypeptide sequence pairs.

35 Alternatively the NCBI BLAST software suite may be used. For example, for a pairwise

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

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

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

20 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
25 hybridization is an indication that two nucleic acid sequences share a high degree of complementarity. Specific hybridization complexes form under permissive annealing conditions and remain hybridized after the "washing" step(s). The washing step(s) is particularly important in determining the stringency of the hybridization process, with more stringent conditions allowing less non-specific binding, i.e., binding between pairs of nucleic acid strands that are not perfectly matched. Permissive
30 conditions for annealing of nucleic acid sequences are routinely determinable by one of ordinary skill in the art and may be consistent among hybridization experiments, whereas wash conditions may be varied among experiments to achieve the desired stringency, and therefore hybridization specificity. Permissive annealing conditions occur, for example, at 68°C in the presence of about 6 x SSC, about 1% (w/v) SDS, and about 100 µg/ml sheared, denatured salmon sperm DNA.

35 Generally, stringency of hybridization is expressed, in part, with reference to the temperature

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

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

The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary bases. A hybridization complex may be formed in solution (e.g., C_{3t} or R_{3t} analysis) or formed between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., paper, membranes, filters, chips, pins or glass slides, or any other appropriate substrate to which cells or their nucleic acids have been fixed).

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

"Immune response" can refer to conditions associated with inflammation, trauma, immune disorders, or infectious or genetic disease, etc. These conditions can be characterized by expression of various factors, e.g., cytokines, chemokines, and other signaling molecules, which may affect cellular and systemic defense systems.

An "immunogenic fragment" is a polypeptide or oligopeptide fragment of CARBAP 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 CARBAP which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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.

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

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

"Operably linked" refers to the situation in which a first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with a second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Operably linked DNA sequences may be in close proximity or contiguous and, where
15 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.

20 PNAs preferentially bind complementary single stranded DNA or RNA and stop transcript elongation, and may be pegylated to extend their lifespan in the cell.

"Post-translational modification" of an CARBAP 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
25 vary by cell type depending on the enzymatic milieu of CARBAP.

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding CARBAP, 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.

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

Probes and primers as used in the present invention typically comprise at least 15 contiguous
35 nucleotides of a known sequence. In order to enhance specificity, longer probes and primers may also

WO 02/29055

PCT/US01/30591

be employed, such as probes and primers that comprise at least 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, or at least 150 consecutive nucleotides of the disclosed nucleic acid sequences. Probes and primers may be considerably longer than these examples, and it is understood that any length supported by the specification, including the tables, figures, and Sequence Listing, may be used.

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

 Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to
15 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from
20 megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection
25 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. Hence, this program is useful for identification of both
30 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 polynucleotides in a sample of nucleic acids. Methods of oligonucleotide selection are not limited to those described above.

35 A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 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
5 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.

Alternatively, such recombinant nucleic acids may be part of a viral vector, e.g., based on a
10 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). Regulatory elements interact with host or viral proteins which control transcription,
15 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 other moieties known in the art.

An "RNA equivalent," in reference to a DNA sequence, is composed of the same linear
20 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.

The term "sample" is used in its broadest sense. A sample suspected of containing CARBAP,
25 nucleic acids encoding CARBAP, 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
30 protein or peptide and an agonist, an antibody, an antagonist, a small molecule, or any natural or synthetic binding composition. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure of the protein, e.g., the antigenic determinant or epitope, recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A," the presence of a polypeptide comprising the epitope A, or the presence of free unlabeled A, in a reaction containing free labeled A and the antibody will reduce the amount of labeled A that binds to the antibody.

35 The term "substantially purified" refers to nucleic acid or amino acid sequences that are

WO 02/29055

PCT/US01/30591

removed from their natural environment and are isolated or separated, and are at least 60% free, preferably at least 75% free, and most preferably at least 90% free from other components with which they are naturally associated.

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

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

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

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

20 A "transgenic organism," as used herein, is any organism, including but not limited to animals and plants, in which one or more of the cells of the organism contains heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. The transgenic organisms contemplated in accordance with the present invention include bacteria, cyanobacteria, fungi, plants and animals. The isolated DNA of the present invention can be introduced into the host by methods known in the art, for example infection, transfection, transformation or transconjugation. Techniques for transferring the DNA of the present invention into such organisms are widely known and provided in references such as Sambrook et al. (1989), supra.

30 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

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

25 THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human carbohydrate-associated proteins (CARBAP), the polynucleotides encoding CARBAP, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of cell proliferative, autoimmune/inflammatory, reproductive, and neurological disorders.

30 Table I 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 35 denoted by both a polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:) and

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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.

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 carbohydrate-associated proteins. For example, SEQ ID NO:1 is 28% identical to pig gastric mucin (GenBank ID g915208) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The BLAST probability score is $7.9e-15$, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:2 was analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-2 are described in Table 7.

As shown in Table 4, the full length polynucleotide sequences of the present invention were assembled using cDNA sequences or coding (exon) sequences derived from genomic DNA, or any combination of these two types of sequences. Columns 1 and 2 list the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO.) and the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte Polynucleotide ID) for each polynucleotide of the invention. Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:3-4 or that distinguish between SEQ ID NO:3-4 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

The identification numbers in Column 5 of Table 4 may refer specifically, for example, to
 5 Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. For example, 7050545H1 is the identification number of an Incyte cDNA sequence, and BRACNOK02 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., 70851245V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to GenBank cDNAs or ESTs (e.g., g1698302) which contributed to the assembly of the full
 10 length polynucleotide sequences. In addition, the identification numbers in column 5 may identify sequences derived from the ENSEMBL (The Sanger Centre, Cambridge, UK) database (*i.e.*, those sequences including the designation "ENST"). Alternatively, the identification numbers in column 5 may be derived from the NCBI RefSeq Nucleotide Sequence Records Database (*i.e.*, those sequences including the designation "NM" or "NT") or the NCBI RefSeq Protein Sequence Records (*i.e.*, those sequences including the designation "NP"). Alternatively, the identification numbers in column 5
 15 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching" algorithm. For example, FL_XXXXXX_N₁_N₂_YYYYY_N₃_N₄ represents a "stitched" sequence in which XXXXXX is the identification number of the cluster of sequences to which the algorithm was applied, and YYYYY is the number of the prediction generated by the algorithm, and
 20 N_{1,2,3,4}, if present, represent specific exons that may have been manually edited during analysis (See Example V). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to assemblages of exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example,
 FLXXXXX_gAAAAA_gBBBBB_1_N is the identification number of a "stretched" sequence, with XXXXXX being the Incyte project identification number, gAAAAA being the GenBank identification
 25 number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching" algorithm was applied, gBBBBB being the GenBank identification number or NCBI RefSeq identification number of the nearest GenBank protein homolog, and N referring to specific exons (See Example V). In instances where a RefSeq sequence was used as a protein homolog for the "exon-stretching" algorithm, a RefSeq identifier (denoted by "NM," "NP," or "NT") may be used in place of the GenBank identifier
 30 (*i.e.*, gBBBBB).

Alternatively, a prefix identifies component sequences that were hand-edited, predicted from genomic DNA sequences, or derived from a combination of sequence analysis methods. The following Table lists examples of component sequence prefixes and corresponding sequence analysis methods associated with the prefixes (see Example IV and Example V).

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Prefix	Type of analysis and/or examples of programs
GNN, GFG, ENST	Exon prediction from genomic sequences using, for example, GENSCAN (Stanford University, CA, USA) or FGENES (Computer Genomics Group, The Sanger Centre, Cambridge, UK).
GBI	Hand-edited analysis of genomic sequences.
FL	Stitched or stretched genomic sequences (see Example V).
INCY	Full length transcript and exon prediction from mapping of EST sequences to the genome. Genomic location and EST composition data are combined to predict the exons and resulting transcript.

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 CARBAP variants. A preferred CARBAP 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 CARBAP amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of CARBAP.

The invention also encompasses polynucleotides which encode CARBAP. In a particular embodiment, the invention encompasses a polynucleotide sequence comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4, which encodes CARBAP. The polynucleotide sequences of SEQ ID NO:3-4, 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 CARBAP. In particular, such a variant polynucleotide sequence will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding CARBAP. 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:3-4 which has at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or even at least about 95% polynucleotide sequence identity to a nucleic acid sequence selected from the group consisting of

WO 02/29055

PCT/US01/30591

SEQ ID NO:3-4. Any one of the polynucleotide variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of CARBAP.

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 CARBAP, some bearing minimal similarity to the polynucleotide sequences of any known and naturally occurring gene, may be produced. Thus, the invention contemplates each and every possible variation of polynucleotide sequence that could be made by selecting combinations based on possible codon choices. These combinations are made in accordance with the standard triplet genetic code as applied to the polynucleotide sequence of naturally occurring CARBAP, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode CARBAP and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring CARBAP under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding CARBAP or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring codons. Codons may be selected to increase the rate at which expression of the peptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the frequency with which particular codons are utilized by the host. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding CARBAP 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 CARBAP and CARBAP 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 CARBAP or any fragment thereof.

Also encompassed by the invention are polynucleotide sequences that are capable of hybridizing to the claimed polynucleotide sequences, and, in particular, to those shown in SEQ ID NO:3-4 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.* 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 DNA polymerase I, SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH), Taq polymerase (Applied Biosystems), thermostable T7 polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ), or

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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), 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 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 CARBAP 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, 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 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 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, 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of CARBAP, 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 CARBAP.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter CARBAP-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 No. 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 CARBAP, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of DNA shuffling and selection/screening. Thus, genetic diversity is created through "artificial" breeding and rapid molecular evolution. For example, fragments of a single gene containing random point mutations may be recombined, screened, and then reshuffled until the desired properties are optimized. Alternatively, fragments of a given gene may be recombined with fragments of

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding CARBAP 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.)

A variety of expression vector/host systems may be utilized to contain and express sequences encoding CARBAP. 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 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 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. 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 CARBAP. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding CARBAP 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 CARBAP into the vector's multiple cloning site disrupts the *lacZ* gene, allowing a colorimetric screening procedure for identification of transformed bacteria containing recombinant molecules. In addition, these vectors may be useful for *in vitro* transcription, dideoxy sequencing, single strand rescue with helper phage, and creation of nested deletions in the cloned sequence. (See, e.g., Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509.) When large quantities of CARBAP are needed, e.g. for the

WO 02/29055

PCT/US01/30591

production of antibodies, vectors which direct high level expression of CARBAP may be used. For example, vectors containing the strong, inducible SP6 or T7 bacteriophage promoter may be used.

Yeast expression systems may be used for production of CARBAP. 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 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 CARBAP. Transcription of sequences encoding CARBAP may be driven by viral promoters, e.g., the 35S and 19S promoters of CaMV used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, N. (1987) *EMBO J.* 6:307-311). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters may be used. (See, e.g., Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; and Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105.)

These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. (See, e.g., *The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill, New York NY, pp. 191-196.)

In mammalian cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, sequences encoding CARBAP 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 infective virus which expresses CARBAP 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.

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

For long term production of recombinant proteins in mammalian systems, stable expression of CARBAP in cell lines is preferred. For example, sequences encoding CARBAP 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for about 1 to 2 days in enriched media before being switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk* and *apr* 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 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 glucuronidase and its substrate β -glucuronide, or luciferase and its substrate luciferin may be used. These markers can be used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system. (See, e.g., Rhodes, C.A. (1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131.)

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on CARBAP 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 CARBAP include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding CARBAP, 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 CARBAP 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 CARBAP may be designed to contain signal sequences which direct secretion of CARBAP through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

CARBAP of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to CARBAP. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for specific binding to CARBAP. 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 CARBAP, 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 CARBAP 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 CARBAP, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli. Cells expressing CARBAP or cell membrane fractions which contain CARBAP are then

WO 02/29055

PCT/US01/30591

contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either CARBAP 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 CARBAP, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of CARBAP 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.

CARBAP of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that modulate the activity of CARBAP. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for CARBAP activity, wherein CARBAP is combined with at least one test compound, and the activity of CARBAP in the presence of a test compound is compared with the activity of CARBAP in the absence of the test compound. A change in the activity of CARBAP in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of CARBAP. Alternatively, a test compound is combined with an *in vitro* or cell-free system comprising CARBAP under conditions suitable for CARBAP activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of CARBAP 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 CARBAP or their mammalian homologs may be "knocked out" in an animal model system using homologous recombination in embryonic stem (ES) cells. Such techniques are well known in the art and are useful for the generation of animal models of human disease. (See, e.g., U.S. Patent No. 5,175,383 and U.S. Patent No. 5,767,337.) For example, mouse ES cells, such as the mouse 129/SvJ cell line, are derived from the early mouse embryo and grown in culture. The ES cells are transformed with a vector containing the gene of interest disrupted by a marker gene, e.g., the neomycin phosphotransferase gene (*neo*; Capecchi, M.R. (1989) *Science* 244:1288-1292). The vector integrates into the corresponding region of the host genome by homologous recombination. Alternatively, homologous recombination takes place using the Cre-loxP system to knockout a gene of interest in a tissue- or developmental stage-specific manner (Marth, J.D. (1996) *Clin. Invest.* 97:1999-2002; Wagner, K.U. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:4323-4330). Transformed ES cells are identified and microinjected into mouse cell blastocysts such as those from the C57BL/6 mouse strain. The blastocysts are surgically transferred to pseudopregnant dams, and the resulting chimeric progeny are genotyped and bred to produce

WO 02/29055

PCT/US01/30591

heterozygous or homozygous strains. Transgenic animals thus generated may be tested with potential therapeutic or toxic agents.

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

Polynucleotides encoding CARBAP can also be used to create "knockin" humanized animals (pigs) or transgenic animals (mice or rats) to model human disease. With knockin technology, a region of a polynucleotide encoding CARBAP is injected into animal ES cells, and the injected sequence integrates into the animal cell genome. Transformed cells are injected into blastulae, and the blastulae are implanted as described above. Transgenic progeny or inbred lines are studied and treated with potential pharmaceutical agents to obtain information on treatment of a human disease. Alternatively, a mammal inbred to overexpress CARBAP, e.g., by secreting CARBAP 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 CARBAP and carbohydrate-associated proteins. In addition, the expression of CARBAP is closely associated with adrenal tumor tissue and posterior cingulate tissue. Therefore, CARBAP appears to play a role in cell proliferative, autoimmune/inflammatory, reproductive, and neurological disorders. In the treatment of disorders associated with increased CARBAP expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of CARBAP. In the treatment of disorders associated with decreased CARBAP expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of CARBAP.

Therefore, in one embodiment, CARBAP 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 CARBAP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; an autoimmune/inflammatory

WO 02/29055

PCT/US01/30591

disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a reproductive disorder such as a disorder of prolactin production, infertility, including tubal disease, ovulatory defects, endometriosis, a disruption of the estrous cycle, a disruption of the menstrual cycle, polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, an endometrial or ovarian tumor, a uterine fibroid, autoimmune disorders, ectopic pregnancy, teratogenesis; cancer of the breast, fibrocystic breast disease, galactorrhea; a disruption of spermatogenesis, abnormal sperm physiology, cancer of the testis, cancer of the prostate, benign prostatic hyperplasia, prostatitis, Peyronie's disease, impotence, carcinoma of the male breast, gynecomastia, hypergonadotropic and hypogonadotropic hypogonadism, pseudohermaphroditism, azoospermia, premature ovarian failure, acrosin deficiency, delayed puberty, retrograde ejaculation and anejaculation, haemangioblastomas, cystisphaeochromocytomas, paraganglioma, cystadenomas of the epididymis, and endolymphatic sac tumours; and 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, 5 postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia.

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

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

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

In a further embodiment, an antagonist of CARBAP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of CARBAP. Examples of such disorders include, but are not limited to, those cell proliferative, autoimmune/inflammatory, 20 reproductive, and neurological disorders described above. In one aspect, an antibody which specifically binds CARBAP may be used directly as an antagonist or indirectly as a targeting or delivery mechanism for bringing a pharmaceutical agent to cells or tissues which express CARBAP.

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

In other embodiments, any of the proteins, antagonists, antibodies, agonists, complementary sequences, or vectors of the invention may be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy may be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The 30 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 CARBAP may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified CARBAP may be used to produce antibodies or to screen libraries of 35 pharmaceutical agents to identify those which specifically bind CARBAP. Antibodies to CARBAP

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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.

5 For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others may be immunized by injection with CARBAP 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
10 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 CARBAP 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
15 fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of CARBAP 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 CARBAP 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
20 limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique. (See, e.g., Kohler, G. et al. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; and Cole, S.P. et al. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120.)

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," such as the
25 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 CARBAP-specific
30 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
35 disclosed in the literature. (See, e.g., Orlandi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

WO 02/29055

PCT/US01/30591

86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)

Antibody fragments which contain specific binding sites for CARBAP 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 CARBAP and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering CARBAP 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 CARBAP. Affinity is expressed as an association constant, K_a, which is defined as the molar concentration of CARBAP-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 CARBAP epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for CARBAP. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular CARBAP epitope, represents a true measure of affinity. High-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10⁹ to 10¹² L/mole are preferred for use in immunoassays in which the CARBAP-antibody complex must withstand rigorous manipulations. Low-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10⁶ to 10⁷ L/mole are preferred for use in immunopurification and similar procedures which ultimately require dissociation of CARBAP, preferably in active form, from the antibody (Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington DC; Liddell, J.E. and A. Cryer (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY).

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

e.g., Catty, *supra*, and Coligan et al. *supra*.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding CARBAP, or any fragment or complement thereof, may be used for therapeutic purposes. In one aspect, modifications of gene expression can be achieved by designing complementary sequences or antisense molecules (DNA, RNA, PNA, or modified oligonucleotides) to the coding or regulatory regions of the gene encoding CARBAP. 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 CARBAP. (See, e.g., Agrawal, S., ed. (1996) *Antisense Therapeutics*, Humana Press Inc., Totawa NJ.)

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

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP expression or regulation causes disease, the expression of CARBAP from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical

5 manifestations caused by the genetic deficiency.

In a further embodiment of the invention, diseases or disorders caused by deficiencies in CARBAP are treated by constructing mammalian expression vectors encoding CARBAP and introducing these vectors by mechanical means into CARBAP-deficient cells. Mechanical transfer technologies for use with cells in vivo or ex vitro include (i) direct DNA microinjection into

10 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 CARBAP include, but are not

15 limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX, PCR2-TOPOTA 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). CARBAP 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

20 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 ocdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter

25 (Rossi, F.M.V. and Blau, H.M. supra), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding CARBAP 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

30 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

35 respect to CARBAP expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the

WO 02/29055

PCT/US01/30591

polynucleotide encoding CARBAP 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; Duil, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent No. 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 CARBAP to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of CARBAP. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Cssets, M.E. et al. (1995) Transplantation 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent No. 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 CARBAP to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of CARBAP. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing CARBAP 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 No. 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent No. 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 CARBAP 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 CARBAP into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of CARBAP-coding RNAs and the synthesis of high levels of CARBAP in vector transduced cells. While alphavirus infection is typically associated with cell lysis within a few days, the ability to establish a persistent infection in hamster normal kidney cells (BHK-21) with a variant of Sindbis virus (SIN) indicates that the lytic replication of alphaviruses can be altered to suit the needs of the gene therapy application (Dryga, S.A. et al. (1997) *Virology* 228:74-83). The wide host range of alphaviruses will allow the introduction of CARBAP into a variety of cell types. The specific transduction of a subset of cells in a population may require the sorting of cells prior to transduction. The methods of manipulating infectious cDNA clones of alphaviruses, performing alphavirus cDNA and RNA transfections, and performing alphavirus infections, are well known to those with ordinary skill in the art.

Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between about positions -10 and +10 from the start site, may also be employed to inhibit gene expression. Similarly, inhibition can be achieved using triple helix base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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, *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 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 CARBAP.

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, 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.

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 CARBAP. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP6. Alternatively, these cDNA constructs that synthesize complementary RNA, constitutively or inducibly, can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

RNA molecules may be modified to increase intracellular stability and half-life. Possible 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding CARBAP. 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 CARBAP expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding CARBAP may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased CARBAP expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding CARBAP 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 CARBAP 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 CARBAP 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 CARBAP. The amount of hybridization may be quantified, thus forming the basis for a comparison of the expression of the polynucleotide both with and without exposure to one or more test compounds. Detection of a change in the expression of a polynucleotide exposed to a test compound indicates that the test compound is effective in altering the expression of the polynucleotide. A screen for a compound effective in altering expression of a specific polynucleotide can be carried out, for example, using a *Schizosaccharomyces pombe* gene expression system (Atkins, D. et al. (1999) U.S. Patent No. 5,932,435; Arndt, G.M. et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E15) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruce, T.W. et al. (1997) U.S.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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.

5 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.)

10 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 CARBAP, antibodies to CARBAP, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of CARBAP.

15 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 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.

20 30 Compositions suitable for use in the invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an effective dose is well within the capability of those skilled in the art.

Specialized forms of compositions may be prepared for direct intracellular delivery of macromolecules comprising CARBAP or fragments thereof. For example, liposome preparations containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

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

10 A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example CARBAP or fragments thereof, antibodies of CARBAP, and agonists, antagonists or inhibitors of CARBAP, 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 ED_{50} (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD_{50} (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 LD_{50}/ED_{50} 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 ED_{50} with little or no toxicity.
15
20 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
25 severity of the disease state, the general health of the subject, the age, weight, and gender of the subject, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and response to therapy. Long-acting compositions may be administered every 3 to 4 days, every week, or biweekly depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts may vary from about 0.1 μg to 100,000 μg , up to a total dose of
30 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.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

DIAGNOSTICS

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

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding CARBAP or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode CARBAP. 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 CARBAP, allelic variants, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of related sequences, and may have at least 50% sequence identity to any of the CARBAP encoding sequences. The hybridization probes of the

WO 02/29055

PCT/US01/30591

subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:3-4 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the CARBAP gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding CARBAP include the cloning of polynucleotide sequences encoding CARBAP or CARBAP 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 coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding CARBAP may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of CARBAP. Examples of such disorders include, but are not limited to, a cell proliferative disorder such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus; an autoimmune/inflammatory disorder such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hypereosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a reproductive disorder such as a disorder of prolactin production, infertility, including tubal disease, ovulatory defects, endometriosis, a disruption of the estrous cycle, a disruption of the menstrual cycle, polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, an endometrial or ovarian tumor, a uterine fibroid, autoimmune disorders, ectopic pregnancy, teratogenesis; cancer of the breast,

WO 02/29055

PCT/US01/30591

fibrocystic breast disease, galactorrhea, a disruption of spermatogenesis, abnormal sperm physiology, cancer of the testis, cancer of the prostate, benign prostatic hyperplasia, prostatitis, Peyronie's disease, impotence, carcinoma of the male breast, gynecomastia, hypergonadotropic and hypogonadotropic hypogonadism, pseudohermaphroditism, azoospermia, premature ovarian failure, acrosin deficiency, delayed puberty, retrograde ejaculation and anejaculation, haemangioblastomas, cystsphaeochromocytomas, paraganglioma, cystadenomas of the epididymis, and endolymphatic sac tumours; and 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), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia. The polynucleotide sequences encoding CARBAP may be used in Southern or northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; in dipstick, pin, and multiformat ELISA-like assays; and in microarrays utilizing fluids or tissues from patients to detect altered CARBAP expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding CARBAP may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding CARBAP may be labeled by standard methods and added to a fluid or tissue sample from a patient under conditions suitable for the formation of hybridization complexes. After a suitable incubation period, the sample is washed and the signal is quantified and compared with a standard value. If the amount of signal in the patient sample is significantly altered in comparison to a control sample then the presence of altered levels of nucleotide sequences encoding CARBAP in

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP, 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 CARBAP, 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 CARBAP 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 CARBAP, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding CARBAP, 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.

In a particular aspect, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding CARBAP 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,

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

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

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

described above.

A particular embodiment relates to the use of the polynucleotides of the present invention to generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent No. 5,840,484, expressly incorporated by reference herein.) Thus a transcript image may be generated by hybridizing the polynucleotides of the present invention or their complements to the totality of transcripts or reverse transcripts of a particular tissue or cell type. In one embodiment, the hybridization takes place in high-throughput format, wherein the polynucleotides of the present invention or their complements comprise a subset of a plurality of elements on a microarray. The resultant transcript image would provide a profile of gene activity.

Transcript images may be generated using transcripts isolated from tissues, cell lines, biopsies, or other biological samples. The transcript image may thus reflect gene expression in vivo, as in the case of a tissue or biopsy sample, or in vitro, as in the case of a cell line.

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP to quantify the levels of CARBAP expression. In one embodiment, the antibodies are used as elements on a microarray, and protein expression levels are quantified by exposing the microarray to the sample and detecting the levels of protein bound to each array element (Lueking, A. et al. (1999) *Anal. Biochem.* 270:103-111; Mendozze, 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

each array element.

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

In another embodiment, the toxicity of a test compound is assessed by treating a biological sample containing proteins with the test compound. Proteins that are expressed in the treated biological sample are separated so that the amount of each protein can be quantified. The amount of each protein is compared to the amount of the corresponding protein in an untreated biological sample. A difference in the amount of protein between the two samples is indicative of a toxic response to the test compound in the treated sample. Individual proteins are identified by sequencing the amino acid residues of the 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 CARBAP may be used to generate hybridization probes useful in mapping the naturally occurring genomic sequence. Either coding or noncoding sequences may be used, and in some instances, noncoding sequences may be preferable over coding sequences. For example, conservation of a coding sequence among

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP 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, CARBAP, 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 CARBAP and the agent being tested may be measured.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest. (See, e.g., Geysen, et al. (1984) PCT

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode CARBAP 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. 60/237,456, are expressly incorporated by reference herein.

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA) and shown in Table 4, column 5. Some tissues were homogenized and lysed in guanidinium isothiocyanate, while others were homogenized and lysed in 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 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

purification kit (Ambion, Austin TX).

In some cases, Stratagene was provided with RNA and constructed the corresponding cDNA libraries. Otherwise, cDNA was synthesized and cDNA libraries were constructed with the UNIZAP vector system (Stratagene) or SUPERSKRIP plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, *supra*, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4E 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., PBLUESKRIP plasmid (Stratagene), FSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), PCR2-TOPOTA plasmid (Invitrogen), PCMV-ICIS plasmid (Stratagene), pGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA), or pINCY (Incyte Genomics), 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.

II. Isolation of cDNA Clones

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

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

III. Sequencing and Analysis

Incyte cDNA recovered in plasmids as described in Example II were sequenced as follows. Sequencing reactions were processed using standard methods or high-throughput instrumentation such as the ABI CATALYST 800 (Applied Biosystems) thermal cycler or the PTC-200 thermal

WO 02/29055

PCT/US01/30591

cycler (MJ Research) in conjunction with the HYDRA microdispenser (Robbins Scientific) or the MICROLAB 2200 (Hamilton) liquid transfer system. cDNA sequencing reactions were prepared using reagents provided by Amersham Pharmacia Biotech or supplied in ABI sequencing kits such as the ABI PRISM BIGDYE Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems).

- 5 Electrophoretic separation of cDNA sequencing reactions and detection of labeled polynucleotides were carried out using the MEGABACE 1000 DNA sequencing system (Molecular Dynamics); the ABI PRISM 373 or 377 sequencing system (Applied Biosystems) in conjunction with standard ABI protocols and base calling software; or other sequence analysis systems known in the art. Reading frames within the cDNA sequences were identified using standard methods (reviewed in Ausubel, 10 1997, supra, unit 7.7). Some of the cDNA sequences were selected for extension using the techniques disclosed in Example VIII.

- The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The 15 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, 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.) 20 The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched sequences, stretched sequences, or Genscan-predicted coding sequences (see Examples IV and V) were used to extend Incyte cDNA assemblages to full length. Assembly was performed using programs based on Phred, Phrap, and 25 Consed, and cDNA assemblages were screened for open reading frames using programs based on GeneMark, BLAST, and FASTA. The full length polynucleotide sequences were translated to derive the corresponding full length polypeptide sequences. Alternatively, a polypeptide of the invention may begin at any of the methionine residues of the full length translated polypeptide. Full length polypeptide sequences were subsequently analyzed by querying against databases such as the 30 GenBank protein databases (genpept), SwissProt, BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, Prosite, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. Full length polynucleotide sequences are also analyzed using MACDNASIS PRO software (Hitachi Software Engineering, South San Francisco CA) and LASERGENE software (DNASTAR). Polynucleotide and polypeptide sequence alignments are generated using default parameters specified by the 35 CLUSTAL algorithm as incorporated into the MEGALIGN multisequence alignment program

WO 02/29055

PCT/US01/30591

(DNASTAR), which also calculates the percent identity between aligned sequences.

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

The programs described above for the assembly and analysis of full length polynucleotide and polypeptide sequences were also used to identify polynucleotide sequence fragments from SEQ ID NO:3-4. 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 carbohydrate-associated proteins were initially identified by running the Genscan gene identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpr1 and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) *J. Mol. Biol.* 268:78-94, and Burge, C. and S. Karlin (1998) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:346-354). The program concatenates predicted exons to form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of Genscan is a FASTA database of polynucleotide and polypeptide sequences. The maximum range of sequence for Genscan to analyze at once was set to 30 kb. To determine which of these Genscan predicted cDNA sequences encode carbohydrate-associated proteins, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for carbohydrate-associated proteins. Potential carbohydrate-associated proteins were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as carbohydrate-associated proteins. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbpr1 public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from genpept to correct errors in the sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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
5 identification program described in Example IV. Partial cDNAs assembled as described in Example
III were mapped to genomic DNA and parsed into clusters containing related cDNAs and Genscan
exon predictions from one or more genomic sequences. Each cluster was analyzed using an algorithm
based on graph theory and dynamic programming to integrate cDNA and genomic information,
generating possible splice variants that were subsequently confirmed, edited, or extended to create a
10 full length sequence. Sequence intervals in which the entire length of the interval was present on
more than one sequence in the cluster were identified, and intervals thus identified were considered to
be equivalent by transitivity. For example, if an interval was present on a cDNA and two genomic
sequences, then all three intervals were considered to be equivalent. This process allows unrelated
but consecutive genomic sequences to be brought together, bridged by cDNA sequence. Intervals
15 thus identified were then "stitched" together by the stitching algorithm in the order that they appear
along their parent sequences to generate the longest possible sequence, as well as sequence variants.
Linkages between intervals which proceed along one type of parent sequence (cDNA to cDNA or
genomic sequence to genomic sequence) were given preference over linkages which change parent
type (cDNA to genomic sequence). The resultant stitched sequences were translated and compared
20 by BLAST analysis to the *genpept* and *gbpri* public databases. Incorrect exons predicted by Genscan
were corrected by comparison to the top BLAST hit from *genpept*. Sequences were further extended
with additional cDNA sequences, or by inspection of genomic DNA, when necessary.

"Stretched" Sequences

Partial DNA sequences were extended to full length with an algorithm based on BLAST
25 analysis. First, partial cDNAs assembled as described in Example III were queried against public
databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases
using the BLAST program. The nearest GenBank protein homolog was then compared by BLAST
analysis to either Incyte cDNA sequences or GenScan exon predicted sequences described in
Example IV. A chimeric protein was generated by using the resultant high-scoring segment pairs
30 (HSPs) to map the translated sequences onto the GenBank protein homolog. Insertions or deletions
may occur in the chimeric protein with respect to the original GenBank protein homolog. The
GenBank protein homolog, the chimeric protein, or both were used as probes to search for
homologous genomic sequences from the public human genome databases. Partial DNA sequences
were therefore "stretched" or extended by the addition of homologous genomic sequences. The
35 resultant stretched sequences were examined to determine whether it contained a complete gene.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

VI. Chromosomal Mapping of CARBAP Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:3-4 were compared with sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:3-4 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been previously mapped. Inclusion of a mapped sequence in a cluster resulted in the assignment of all sequences of that cluster, including its particular SEQ ID NO., to that map location.

Map locations are represented by ranges, or intervals, of human chromosomes. The map position of an interval, in centiMorgans, is measured relative to the terminus of the chromosome's p-arm. (The centiMorgan (cM) is a unit of measurement based on recombination frequencies between chromosomal markers. On average, 1 cM is roughly equivalent to 1 megabase (Mb) of DNA in humans, although this can vary widely due to hot and cold spots of recombination.) The cM distances are based on genetic markers mapped by Généthon which provide boundaries for radiation hybrid markers whose sequences were included in each of the clusters. Human genome maps and other resources available to the public, such as the NCBI "GeneMap'99" World Wide Web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>), can be employed to determine if previously identified disease genes map within or in proximity to the intervals indicated above.

VII. Analysis of Polynucleotide Expression

Northern analysis is a laboratory technique used to detect the presence of a transcript of a gene and involves the hybridization of a labeled nucleotide sequence to a membrane on which RNAs from a particular cell type or tissue have been bound. (See, e.g., Sambrook, *supra*, ch. 7; Ausubel (1995) *supra*, ch. 4 and 16.)

Analogous computer techniques applying BLAST were used to search for identical or related molecules in cDNA databases such as GenBank or LIFESEQ (Incyte Genomics). This analysis is much faster than multiple membrane-based hybridizations. In addition, the sensitivity of the computer search can be modified to determine whether any particular match is categorized as exact or similar. The basis of the search is the product score, which is defined as:

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

The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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 CARBAP 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 CARBAP. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of CARBAP Encoding Polynucleotides

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 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

result in hairpin structures and primer-primer dimerizations was avoided.

Selected human cDNA libraries were used to extend the sequence. If more than one extension was necessary or desired, additional or nested sets of primers were designed.

High fidelity amplification was obtained by PCR using methods well known in the art. PCR 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 (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; 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 (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 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, 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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:3-4 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μ Ci of [γ - 32 P] adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10^7 counts per minute of the labeled probe is used in a typical membrane-based hybridization analysis of human genomic DNA digested with one of the following endonucleases: Ase I, Bgl II, Eco RI, Pst I, Xba I, or Pvu II (DuPont NEN).

The DNA from each digest is fractionated on a 0.7% agarose gel and transferred to nylon membranes (Nytran Plus, Schleicher & Schuell, Durham NH). Hybridization is carried out for 16 hours at 40°C. To remove nonspecific signals, blots are sequentially washed at room temperature under conditions of up to, for example, 0.1 x saline sodium citrate and 0.5% sodium dodecyl sulfate.

Hybridization patterns are visualized using autoradiography or an alternative imaging means and compared.

X. Microarrays

The linkage or synthesis of array elements upon a microarray can be achieved utilizing photolithography, piezoelectric printing (ink-jet printing, See, e.g., Baldeschweiler, *supra*), mechanical microspotting technologies, and derivatives thereof. The substrate in each of the aforementioned technologies should be uniform and solid with a non-porous surface (Schna (1999), *supra*). Suggested substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding procedures. A typical array may be produced using available methods and machines well known to

WO 02/29055

PCT/US01/30591

those of ordinary skill in the art and may contain any appropriate number of elements. (See, e.g., Schena, 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
5 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
10 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.

15 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/ μ l oligo-(dT) primer (21mer), 1X
first strand buffer, 0.03 units/ μ l RNase inhibitor, 500 μ M dATP, 500 μ M dGTP, 500 μ M dTTP, 40
20 μ M dCTP, 40 μ M 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
25 incubated for 20 minutes at 85°C to stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified
using two successive CHROMA SPIN 30 gel filtration spin columns (CLONTECH Laboratories, Inc.
(CLONTECH), Palo Alto CA) and after combining, both reaction samples are ethanol precipitated
using 1 ml of glycogen (1 mg/ml), 60 ml sodium acetate, and 300 ml of 100% ethanol. The sample is
then dried to completion using a SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) and
30 resuspended in 14 μ l 5X SSC/0.2% SDS.

Microarray Preparation

Sequences of the present invention are used to generate array elements. Each array element
is amplified from bacterial cells containing vectors with cloned cDNA inserts. PCR amplification
uses primers complementary to the vector sequences flanking the cDNA insert. Array elements are
35 amplified in thirty cycles of PCR from an initial quantity of 1-2 ng to a final quantity greater than 5

WO 02/29055

PCT/US01/30591

µg. Amplified array elements are then purified using SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech).

Purified array elements are immobilized on polymer-coated glass slides. Glass microscope slides (Corning) are cleaned by ultrasound in 0.1% SDS and acetone, with extensive distilled water washes between and after treatments. Glass slides are etched in 4% hydrofluoric acid (VWR Scientific Products Corporation (VWR), West Chester PA), washed extensively in distilled water, and coated with 0.05% aminopropyl silane (Sigma) in 95% ethanol. Coated slides are cured in a 110°C oven.

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in U.S. Patent No. 5,807,522, incorporated herein by reference. 1 µl of the array element DNA, at an average concentration of 100 ng/µl, 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 µl of sample mixture consisting of 0.2 µg 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 µl of 5X SSC in a corner of the chamber. The chamber containing the arrays is incubated for about 6.5 hours at 60°C. The arrays are washed for 10 min at 45°C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45°C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

Detection

Reporter-labeled hybridization complexes are detected with a microscope equipped with an Innova 70 mixed gas 10 W laser (Coherent, Inc., Santa Clara CA) capable of generating spectral lines at 488 nm for excitation of Cy3 and at 632 nm for excitation of Cy5. The excitation laser light is focused on the array using a 20X microscope objective (Nikon, Inc., Melville NY). The slide containing the array is placed on a computer-controlled X-Y stage on the microscope and raster-scanned past the objective. The 1.8 cm x 1.8 cm array used in the present example is scanned with a resolution of 20 micrometers.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

In two separate scans, a mixed gas multiline laser excites the two fluorophores sequentially. Emitted light is split, based on wavelength, into two photomultiplier tube detectors (PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ) corresponding to the two fluorophores. Appropriate filters positioned between the array and the photomultiplier tubes are used to filter the signals. The emission maxima of the fluorophores used are 565 nm for Cy3 and 650 nm for Cy5. Each array is typically scanned twice, one scan per fluorophore using the appropriate filters at the laser source, although the apparatus is capable of recording the spectra from both fluorophores simultaneously.

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 from different sources (e.g., representing test and control cells), each labeled with a different fluorophore, are hybridized to a single array for the purpose of identifying genes that are differentially expressed, the calibration is done by labeling samples of the calibrating cDNA with the two fluorophores and adding identical amounts of each to the hybridization mixture.

The output of the photomultiplier tube is digitized using a 12-bit RTI-835H analog-to-digital (A/D) conversion board (Analog Devices, Inc., Norwood MA) installed in an IBM-compatible PC computer. The digitized data are displayed as an image where the signal intensity is mapped using a linear 20-color transformation to a pseudocolor scale ranging from blue (low signal) to red (high signal). The data is also analyzed quantitatively. Where two different fluorophores are excited and measured simultaneously, the data are first corrected for optical crosstalk (due to overlapping emission spectra) between the fluorophores using each fluorophore's emission spectrum.

A grid is superimposed over the fluorescence signal image such that the signal from each spot is centered in each element of the grid. The fluorescence signal within each element is then integrated to obtain a numerical value corresponding to the average intensity of the signal. The software used for signal analysis is the GEMTOOLS gene expression analysis program (Incyte).

XI. Complementary Polynucleotides

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

transcript.

XII. Expression of CARBAP

Expression and purification of CARBAP is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of CARBAP 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* (*lac*) 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 CARBAP upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of CARBAP 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 CARBAP 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, B.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

In most expression systems, CARBAP 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 CARBAP at specifically engineered sites. FLAG, an 8-amino acid peptide, enables immunoaffinity purification using commercially available monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies (Eastman Kodak). 6-His, a stretch of six consecutive histidine residues, enables purification on metal-chelate resins (QIAGEN). Methods for protein expression and purification are discussed in Ausubel (1995, *supra*, ch. 10 and 16). Purified CARBAP obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI and XVII, where applicable.

XIII. Functional Assays

CARBAP function is assessed by expressing the sequences encoding CARBAP 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

XIV. Production of CARBAP Specific Antibodies

CARBAP substantially purified using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; see, e.g., Harrington, M.G. (1990) *Methods Enzymol.* 182:488-495), or other purification techniques, is used to immunize rabbits and to produce antibodies using standard protocols.

Alternatively, the CARBAP 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.)

WO 02/29055

PCT/US01/30591

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

XV. Purification of Naturally Occurring CARBAP Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant CARBAP is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for CARBAP. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-CARBAP 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 CARBAP are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of CARBAP (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/CARBAP binding (e.g., a buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and CARBAP is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with CARBAP

CARBAP, 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 CARBAP, washed, and any wells with labeled CARBAP complex are assayed. Data obtained using different concentrations of CARBAP are used to calculate values for the number, affinity, and association of CARBAP with the candidate molecules.

Alternatively, molecules interacting with CARBAP 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).

CARBAP 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 CARBAP Activity

CARBAP activity is demonstrated as the ability to bind to β -galactoside sugars. CARBAP is

WO 02/29055

PCT/US01/30591

applied to a lactosyl-Sepharose column, and the column is eluted with 0.1 M lactose. The presence of CARBAP in the eluate is detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and indicates the ability of CARBAP to bind β -galactoside sugars.

An alternative assay for CARBAP is demonstrated as the ability to hydrolyze HA

5 (Lepperdinger, *supra*). Radioactively labeled HA is immobilized on microtiter plates with the aid of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and N-hydroxy-sulfosuccinimide. The radioactivity solubilized after incubation with CARBAP is measured using a liquid scintillation counter and is proportional to the CARBAP in the starting sample.

Alternatively, CARBAP activity is measured by its ability to regulate transformation of
10 NIH3T3 mouse fibroblast cells. A cDNA encoding CARBAP is subcloned into an appropriate eukaryotic expression vector. This construct is transfected into NIH3T3 cells using methods known in the art. Transfected cells are compared with non-transfected cells for the following quantifiable properties characteristic of oncogenically transformed cells: growth in culture to high density associated with loss of contact inhibition, growth in suspension or in soft agar, lowered serum
15 requirements, and ability to induce tumors when injected into immunodeficient mice. The activity of CARBAP is proportional to the extent of transformation of NIH3T3 cells transfected with CARBAP and non-transfected cells.

Various modifications and variations of the described methods and systems of the invention
20 will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with certain embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the
25 scope of the following claims.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
219781S	1	219781C01	3	219781C01
236953A	2	236953A01	4	236953A01

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide SEQ ID NO:	GenBank ID NO:	Probability Score	GenBank Homolog
1	2197815CD1	g11275988	0	[Homo sapiens] testis development protein PVTD
2	2369534CD1	g2930243	4.10E-14	[Horddeum vulgare] extensin

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 3

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods
1	2197815CD1	878	S13, S26, S53, S70, S149, S289, S364, S448, S454, S540, S615, S626, S641, S675, S731, S716, S756, S875, S863, T112, T198, T217, T224, T288, T473, T575, T614, T571, T838	N128, N315	CODED FOR BY C. ELEGANS CDNA YK86D12.3; PD148401; M328-Q552, I192-K219	ELAST- PRODOM
2	2369534CD1	156	T145, S74, S152	N135	PROTEIN REPENT SIGNAL, PRECURSOR PRION GLYCOPROTEIN NUCLEAR GPIANCHOR BRAIN MAJOR PD001091; R2-S152	ELAST- PRODOM

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragments	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
3	2197615CB1	4836	1-1899	7647774J2 (URSSTUE01)	586	1333
			4736-4836	3450259I6 (URSSTUE03)	2397	3086
			1094-1103	7050545HL (BRACNOR02)	2164	2832
			1-949	E910455F6 (CONNTU01)	4359	4836
			370-380	1968123R6 (BRSTNOR04)	3777	4109
			373-381	4523354F6 (HNT2TK01)	550	1051
			4595-4836	70851245V1	3400	4060
			1598-1787	7168435HL (MCRNOC01)	1168	1760
				6492770HL (MIXDUN01)	1710	2352
				6667810HL (BRAGNOR02)	2859	3507
				1795917R6 (PROSTU05)	4139	4616
				7163777HL (FLACNOR01)	1288	1900
4	2369534CB1	3239	1-51	2997273HL (OVARU07)	1893	2154
			1855-2812	7664992HL (URSSTUE01)	2678	3239
			2546-3239	2942126H2 (CONNTU05)	2159	2412
			1-41	8169830J2	1	525
			804-1942	7336360HL (CONFDM02)	253	795
				6913630J1 (PATUDLR01)	1270	1858
				1399190HL (BRAJUT08)	21	266
				7045297ZV1	171	791
				7241031HL (PROSTAY01)	807	1409
				7159840HL (HNT2TK01)	1513	2038
				7764247HL (URSTUE01)	565	1189
				7604102J1 (ESOSTUE01)	2230	2865

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Project ID	Representative Library
3	217515CBL	BHAC0002
4	2369534CBL	ADREPT06

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 6

Library	Vector	Library Description
ADRETTU06	pUNCY	Library was constructed using RNA isolated from adrenal tumor tissue removed from a 57-year-old Caucasian female during a unilateral right adrenalectomy. Pathology indicated pheochromocytoma, forming a nodular mass completely replacing the medulla of the adrenal gland.
BRACWOK02	PSPORT1	This amplified and normalized library was constructed using RNA isolated from posterior cingulate tissue removed from an 85-year-old Caucasian female who died from myocardial infarction and retroperitoneal hemorrhage. Pathology indicated atherosclerosis, moderate to severe, involving the circle of Willis, middle cerebral, basilar and vertebral arteries; infarction, remote, left dentate nucleus; and amyloid plaque deposition consistent with age. There was mild to moderate leptomenigeal fibrosis, especially over the convexity of the frontal lobe. There was mild generalized atrophy involving all lobes. The white matter was mildly thinned. Cortical thickness in the temporal lobes, both maximal and minimal, was slightly reduced. The substantia nigra pars compacta appeared mildly depigmented. Patient history included COPD, hypertension, and recurrent deep venous thrombosis. 6.4 million independent clones from this amplified library were normalized in one round using conditions adapted Soares et al., PNAS (1994) 91:9228-9232 and Bonaldo et al., Genome Research 6 (1996):791.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 7

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ABIFACTURA	A program that removes vector sequences and masks ambiguous bases in nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABIPARACEL FDF	A Fast Data Finder useful in comparing and annotating amino acid or nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	Mismatch <50%
ABI AutoAssembler	A program that assembles nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	A Basic Local Alignment Search Tool useful in sequence similarity search for amino acid and nucleic acid sequences. BLAST includes five functions: blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx.	Altschul, S.F. et al. (1990) <i>J. Mol. Biol.</i> 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) <i>Nucleic Acids Res.</i> 25:3389-3402.	ESY3: Probability value= 1.0E-8 or less <i>Full Length sequences</i> : 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, tfasta, fastx, tfastx, and search.	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) <i>Methods Enzymol.</i> 183:63-98; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) <i>Adv. Appl. Math.</i> 2:482-489.	ESY3: fasta E value=1.06E-6 <i>Assembled ESY3</i> : fasta Identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fastx E value=1.0E-8 or less <i>Full Length sequences</i> : fastx score=100 or greater
BLIMFS	A BLocks IMProved Searcher that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) <i>Nucleic Acids Res.</i> 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) <i>Methods Enzymol.</i> 266:88-105; and Atwood, T.K. et al. (1997) <i>J. Chem. Inf. Comput. Sci.</i> 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
HMMER	An algorithm for searching a query sequence against hidden Markov model (HMM)-based databases of protein family consensus sequences, such as PFAM.	Krogh, A. et al. (1994) <i>J. Mol. Biol.</i> 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. et al. (1988) <i>Nucleic Acids Res.</i> 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) <i>Our World View</i> , in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM hits: Probability value= 1.0E-3 or less <i>Signal peptide hits</i> : Score= 0 or greater

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Table 7 (cont.)

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ProfilesScan	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; Batroch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality scores:GCG-specified "HGH" 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, R. 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.	Scores= 120 or greater; Match length= 56 or greater
Consed	A graphical tool for viewing and editing Phrap assemblies.	Gordon, D. et al. (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	A weight matrix analysis program that scans protein sequences for the presence of secretory signal peptides.	Nielson, H. et al. (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (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. 5:363-371.	
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.	Batroch, 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 02/29055

PCT/US01/30591

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 SEQ ID NO:1-2,
 - b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2,
 - c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, and
 - d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.
2. An isolated polypeptide of claim 1 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.
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 comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4.
6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a polynucleotide of claim 3.
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 of producing a polypeptide of claim 1, the method comprising:
 - 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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

b) recovering the polypeptide so expressed.

10. A method of claim 9, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.

5

11. An isolated antibody which specifically binds to a polypeptide of claim 1.

12. An isolated polynucleotide selected from the group consisting of:

- 10
- a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4,
 - b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3-4,
 - c) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),
 - 15 d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b), and
 - e) an RNA equivalent of a)-d).

13. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 12.

20

14. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 12, the method comprising:

- 25
- 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.
- 30

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

16. A method of detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 12, the method comprising:

- 35
- a) amplifying said target polynucleotide or fragment thereof using polymerase chain

WO 02/29055

PCT/US01/30591

- reaction amplification, and
- b) detecting the presence or absence of said amplified target polynucleotide or fragment thereof, and, optionally, if present, the amount thereof.
- 5 17. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.
18. A composition of claim 17, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.
- 10 19. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional CARBAP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 17.
- 15 20. A method of 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 21. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 20 and a pharmaceutically acceptable excipient.
22. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional CARBAP, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition
- 25 of claim 21.
23. A method of 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
- 30 b) detecting antagonist activity in the sample.
24. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 23 and a pharmaceutically acceptable excipient.
- 35 25. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional

WO 02/29055

PCT/US01/30591

CARBAP, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 24.

26. A method of screening for a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1, the method comprising:

- 5
- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and
 - 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.

10 27. A method of screening for a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1, the 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
15 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
20 presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

28. A method of 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:

- 25
- 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
30 amounts of the compound and in the absence of the compound.

29. A method of assessing toxicity of a test compound, the 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
35 at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 12 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target

WO 02/29055

PCT/US01/30591

- polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim 12 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.
- 5
30. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of CARBAP in a biological sample, the method comprising:
- 10 a) combining the biological sample with an antibody of claim 11, under conditions suitable 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.
- 15
31. The antibody of claim 11, wherein the antibody is:
- a) a chimeric antibody,
- b) a single chain antibody,
- 20 c) a Fab fragment,
- d) a F(ab')₂ fragment, or
- e) a humanized antibody.
32. A composition comprising an antibody of claim 11 and an acceptable excipient.
- 25
33. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of CARBAP in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 32.
- 30
34. A composition of claim 32, wherein the antibody is labeled.
35. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of CARBAP in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 34.
- 35

WO 02/29055

PCT/US01/30591

36. A method of preparing a polyclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 11, the method comprising:
- a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response,
 - b) isolating antibodies from said animal, and
 - 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:1-2.
37. A polyclonal antibody produced by a method of claim 36.
38. A composition comprising the polyclonal antibody of claim 37 and a suitable carrier.
39. A method of making a monoclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 11, the method comprising:
- a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response,
 - b) isolating antibody producing cells from the animal,
 - 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:1-2.
40. A monoclonal antibody produced by a method of claim 39.
41. A composition comprising the monoclonal antibody of claim 40 and a suitable carrier.
42. The antibody of claim 11, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.
43. The antibody of claim 11, wherein the antibody is produced by screening a recombinant

WO 02/29055

PCT/US01/30591

immunoglobulin library.

44. A method of detecting a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2 in a sample, the method comprising:

- 5 a) incubating the antibody of claim 11 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide, and
- 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:1-2 in the sample.
- 10

45. A method of purifying a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2 from a sample, the method comprising:

- a) incubating the antibody of claim 11 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide, and
- 15 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:1-2.

46. A microarray wherein at least one element of the microarray is a polynucleotide of claim 20 13.

47. A method of generating a transcript image of a sample which contains polynucleotides, the method comprising:

- a) labeling the polynucleotides of the sample,
- 25 b) contacting the elements of the microarray of claim 46 with the labeled polynucleotides of the sample under conditions suitable for the formation of a hybridization complex, and
- c) quantifying the expression of the polynucleotides in the sample.

48. An array comprising different nucleotide molecules affixed in distinct physical locations on a solid substrate, wherein at least one of said nucleotide molecules comprises a first oligonucleotide or polynucleotide sequence specifically hybridizable with at least 30 contiguous nucleotides of a target polynucleotide, and wherein said target polynucleotide is a polynucleotide of claim 12.

30

35

WO 02/29055

PCT/US01/30591

49. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to at least 30 contiguous nucleotides of said target polynucleotide.
50. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to at least 60 contiguous nucleotides of said target polynucleotide.
51. An array of claim 48, wherein said first oligonucleotide or polynucleotide sequence is completely complementary to said target polynucleotide.
52. An array of claim 48, which is a microarray.
53. An array of claim 48, further comprising said target polynucleotide hybridized to a nucleotide molecule comprising said first oligonucleotide or polynucleotide sequence.
54. An array of claim 48, wherein a linker joins at least one of said nucleotide molecules to said solid substrate.
55. An array of claim 48, wherein each distinct physical location on the substrate contains multiple nucleotide molecules, and the multiple nucleotide molecules at any single distinct physical location have the same sequence, and each distinct physical location on the substrate contains nucleotide molecules having a sequence which differs from the sequence of nucleotide molecules at another distinct physical location on the substrate.
56. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.
57. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
58. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3.
59. A polynucleotide of claim 12, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:4.

WO 02/29055

PCT/US01/30591

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
 TANG, Y. Tom
 ELLIOTT, Vicki S.
 YUE, Henry
 LAL, Preeti
 WALIA, Narinder K.

<120> CARBOHYDRATE-ASSOCIATED PROTEINS

<130> PF-0817 PCT

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 60/237,456

<151> 2000-10-02

<160> 4

<170> PERL Program

<210> 1

<211> 678

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 2197815CD1

<400> 1

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

WO 02/29055

PCT/US01/30591

Gly Ala Glu Ala Leu Ser Leu Leu Leu Lys Arg Pro Trp Asp Pro
 245 250 255
 Ala Val Gly Val Leu Ser His Asn Lys Pro Ser Lys Leu Pro Gly
 260 265 270
 Ser Pro Leu Ile Leu Ile Ala Ser Ser Gly Pro Ser Ser Ser Val
 275 280 285
 Phe Pro Thr Ser Arg Arg His Arg Phe Trp Gln Ser Gln Leu Ser
 290 295 300
 Cys Leu Gly Lys Val Ile Pro Val Ala Thr His Leu Leu Asn Asn
 305 310 315
 Gly Ser Gly Val Gly Val Leu Gln Cys Leu Glu His Met Ile Gly
 320 325 330
 Ala Val Arg Ser Lys Val Leu Glu Ile His Ser His Phe Pro His
 335 340 345
 Lys Pro Ile Ile Leu Ile Gly Trp Asn Thr Gly Ala Leu Val Ala
 350 355 360
 Cys His Val Ser Val Met Glu Tyr Val Thr Ala Val Val Cys Leu
 365 370 375
 Gly Phe Pro Leu Leu Thr Val Asp Gly Pro Arg Gly Asp Val Asp
 380 385 390
 Asp Pro Leu Leu Asp Met Lys Thr Pro Val Leu Phe Val Ile Gly
 395 400 405
 Gln Asn Ser Leu Gln Cys His Pro Glu Ala Met Glu Asp Phe Arg
 410 415 420
 Glu Lys Ile Arg Ala Glu Asn Ser Leu Val Val Val Gly Gly Ala
 425 430 435
 Asp Asp Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ala Lys Lys Lys Ser Glu Gly
 440 445 450
 Leu Thr Gln Ser Met Val Asp Arg Cys Ile Gln Asp Glu Ile Val
 455 460 465
 Asp Phe Leu Thr Gly Val Leu Thr Arg Ala Glu Gly His Met Gly
 470 475 480
 Ser Glu Pro Arg Asp Gln Asp Ala Glu Lys Lys Lys Lys Pro Arg
 485 490 495
 Asp Val Ala Arg Arg Asp Leu Ala Phe Glu Val Pro Glu Arg Gly
 500 505 510
 Ser Arg Pro Ala Ser Pro Ala Ala Lys Leu Pro Ala Ser Pro Ser
 515 520 525
 Gly Ser Gly Asp Leu Ser Ser Val Ser Ser Ser Pro Thr Ser Ser
 530 535 540
 Pro Lys Thr Lys Val Thr Thr Val Thr Ser Ala Gln Lys Ser Ser
 545 550 555
 Gln Ile Gly Ser Ser Gln Leu Leu Lys Arg His Val Gln Arg Thr
 560 565 570
 Glu Ala Val Leu Thr His Lys Gln Ala Gln Val Pro Ile Ser Ser
 575 580 585
 Glu Pro Pro Glu Glu Gly Glu Lys Glu Asp Leu Arg Val Gln Leu
 590 595 600
 Lys Arg His His Pro Ser Ser Pro Leu Pro Gly Ser Lys Thr Ser
 605 610 615
 Lys Arg Pro Lys Ile Lys Val Ser Leu Ile Ser Gln Gly Asp Thr
 620 625 630
 Ala Gly Gly Pro Cys Ala Pro Ser Gln Gly Ser Ala Pro Glu Ala
 635 640 645
 Ala Gly Gly Lys Pro Ile Thr Met Thr Leu Gly Gln Ala Ser Ala
 650 655 660
 Gly Ala Lys Glu Leu Thr Gly Leu Leu Thr Thr Ala Lys Ser Ser
 665 670 675
 Ser Ser Glu Gly Gly Val Ser Ala Ser Pro Val Pro Ser Val Val
 680 685 690
 Ser Ser Ser Thr Ala Pro Ser Ala Leu His Thr Leu Gln Ser Arg
 695 700 705
 Leu Val Ala Thr Ser Pro Gly Ser Ser Leu Pro Gly Ala Thr Ser

WO 02/29055

PCT/US01/30591

```

710          715          720
Ala Ser Ser Leu Leu Gln Gly Leu Ser Phe Ser Leu Gln Asp Ile
725          730          735
Ser Ser Lys Thr Ser Gly Leu Pro Ala Asn Pro Ser Pro Gly Pro
740          745          750
Ala Pro Gln Ala Thr Ser Val Lys Leu Pro Thr Pro Met Gln Ser
755          760          765
Leu Gly Ala Ile Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ile Val Arg Thr Ile
770          775          780
Pro Val Ala Thr Thr Leu Ser Ser Leu Gly Ala Thr Pro Gly Gly
785          790          795
Lys Pro Thr Ala Ile His Gln Leu Leu Thr Asn Gly Gly Leu Ala
800          805          810
Lys Leu Ala Ser Ser Leu Pro Gly Leu Ala Gln Ile Ser Asn Gln
815          820          825
Ala Ser Gly Leu Lys Val Pro Thr Thr Ile Thr Leu Thr Leu Arg
830          835          840
Gly Gln Pro Ser Arg Ile Thr Thr Leu Ser Pro Met Gly Ser Gly
845          850          855
Ala Ala Pro Ser Glu Glu Ser Ser Ser Gln Val Leu Pro Ser Ser
860          865          870
Ser Gln Arg Leu Pro Pro Ala Pro
875

```

```

<210> 2
<211> 156
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2369534CD1

```

```

<400> 2
Met Ala Gln Pro His Ser Gln Leu Thr Pro Pro Met Ala Arg Pro
1          5          10          15
His Pro Gln Leu Thr Pro Pro Met Thr Arg Pro Arg Pro Gln Leu
20          25          30
Thr Ser Pro Val Thr Arg Pro Arg Pro Gln Leu Thr Phe Pro Met
35          40          45
Ala Arg Pro Cys Pro Gln Leu Thr Pro Pro Ile Ala Ser Pro Ile
50          55          60
His Ser Ser Pro Leu Pro Trp Leu Gly Pro Thr His Ser Ser Pro
65          70          75
Arg Pro Gln Leu Thr Pro Pro Met Thr Arg Pro Arg Pro Gln Leu
80          85          90
Thr Pro Pro Met Ala Pro Trp Ala Ser Leu Pro Leu Leu Pro Lys
95          100          105
Ser Pro Gln Gly Gln Asn Pro Trp Pro Pro Gly Pro Gly Ala Val
110          115          120
Gly Lys Glu Ala Ser Pro Leu Gly Thr Val Ser Met Glu Gln Asn
125          130          135
His Thr Ala Ala Phe Gln Asp His Arg Thr Ala Arg Gln Ala Val
140          145          150
Pro Ser Lys Gly Asp Trp
155

```

```

<210> 3
<211> 4836
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>

```

WO 02/29055

PCT/US01/30591

<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2197815CE1

```

<400> 3
acttaacaga actttgttt cgacaatac gagaggctg aagaagtga gccctagctg 60
ggattcgctt ttttgaggcc ggcgttgccc tgcctcttag gggtgcccac gctctagctg 120
cggccccggc tcccttcgca tegtctgtag aggatgggtg gaagcaaacg agatccttag 180
ctttcaacga attcattatt gtagtttctt gtttgcmaa accctctctg cccacttagg 240
aagtgtgctt ggccaagcaa gtttactgtc tgtccacgcg aggtctttct gaaccttggg 300
gtcgggtgagc tctcccgtta ggtaatttca gttcgtaga ggttgagtat gggcaactc 360
gtggacacat agtttttttt ttcttttttt ttggtgttgg tgtgggattc caagaccogt 420
cccaccacaga ggtctccgct gaattgata ctcaatagga atgatagtag gttacaaaag 480
taacgatgtt agatgggtga gattgggaga aatttaggat attggaattg acctaaactg 540
aaacttttca ctgcaggtag ctacatgca gataccatg ctctgacttt ctgcccctcc 600
actgacatgg cccaccgggg tggggagagg gactccaga ctctagctcg acgactggcg 660
acctcgtctc tcttccagct ttcagtgcac gaacgggagc tggacctggt tttcttggat 720
catagctatg ccaagccttg gagtgcccac ccagatgcca gtagtcccg ccccaccogc 780
atgctctttg tcaactcccc gggcagcac gaagatgcca tgaatcaga cgtcccaata 840
gatgtggaga cggtcacatc aaagcctatg ccactctatg acaatcagaa ggcacgacg 900
gtgatgaatg agtggaagc gcatgtcttc ttgcccaga ctgatgcaga tgcctctctt 960
cccaccgggg actgggagga gatgtcaac aggcctgctt ggacaatggc ccagaaacag 1020
ctattcaaca agatctcaaa agccctgcag tctgaccggc ttgcccgttt ggccaacgaa 1080
ggggcttcta atgagccagt gctgcgccgt gttgcttggg acaagtgtgc aaggagagt 1140
cggcagcctc tggcaagtgt gagctgggat acaagctga tccagtggct gcaaccacc 1200
cttgtggaga ccttgagtct cccatgctgc gcagctacc tggatgcttt gcagcctctg 1260
aaggggaaga tcccaacctt gattgaccgg atgtctgtgt catccaacac aaagactggg 1320
gctgcaagag ctgagccttt gtctctctca ctgaagaggc cctgggaccc tctctgtggg 1380
gtgctttctc ataacaaaac aagcaaacct cctggctctc cctgattctt catgctctc 1440
tctgtctcct ccagctctgt gtttcccact tcaagccgac accgctcttg gcaatctcag 1500
ctgtctctgt tgggcaaggt catcctctga gccaccatc tgcctgaaca tggcagtggg 1560
gtaggagtct tacagttctt cgagcatatg attggggcag tggagaagcaa agtctggag 1620
attcaagccc atttcccaca caaacccatt atcttgattg gctggaacac aggaactttg 1680
gtggctgtct atgtctcagt aatggagtat gtcactgcag ttgtctgctt tgggtttctt 1740
ctgttactgt ttgatggccc cagaggggat gtaactgttc cctcttggc tatgaaact 1800
ccgactctct ttgtcttgg tcagaattcc ctctaatgtc acctgaaagc catggagagc 1860
ttccgggaaa agattcgagc tgagaacagc ttggtgttgg ttgggggagc tgatgacaat 1920
ctcagaataa gcaagcaaaa gaagaatca gaaggttga ctcagagcat ggtgacaga 1980
tgtattcagg atgagattgt ggaactttctg actggatgac tcaactogtc tgggggtcac 2040
atgggctctg aacctcggga tcaggtatgt gagaagaaga agaagccccg cgaatggccc 2100
cgagagactt tggcctttag agtccctgag cggggcagtc gacctgcctc cccagctgcc 2160
aagctgcccg cctcaccctc aggtcagggg gatctctcca gtgtgtccag cagcccaccc 2220
tccagtccca agaccaagt gaccacagtg acctctgcc agaagtccag tcagattgga 2280
agttctcagc tgcgaaagag acatgtgcag cggacagaag cttgtctgac ccaaaacaa 2340
gctcaagttc ccatttcact agaaccacca gaggagggag agaagagga tcttagggtt 2400
cagctgaaag gacaccatcc ctgagttccc ctctctggca gtaagaacct caaacgaccg 2460
aagatcaagg tgcctcttat ctcccaaggg gacacagctg gagggocctg tgcctctcc 2520
caagggaagt ctccagaagc tgcaggtggg aagccatca ccaagacact ggggagagct 2580
tcagcagggg ccaaggagct cacaggactt ctcaaccaag ccaagtccag ttctctgaa 2640
gggtgagctt cagccagccc agtcccttca gtgtgttcca gcagcactgc acccagtgcc 2700
ttcacaacac tgcagagccc cctgggtgccc acatctcctg gcagctccct cccagggccc 2760
acatcagcca gcagcctct ccaagcctcc agcttcagct tgcaggtat cagcagcaag 2820
acctctggcc ttccagcaaa tccctcccca gaccagccc cacaggcccac cagtgtgaag 2880
ttgcccacc ccatcgagag cctgggtgccc atcaccaggg gaccagcac catgtctcgt 2940
accattcctg tggcaccacc tctctctccc ttgggtgcca ctctgtgtgg gaagcccaca 3000
gcatccacc agctgtgac caatgggggc ctgcctaagt tggcaagcag cctcctggc 3060
ctgtctcaga tctcaacca agcatcagcc ttgaaggtcc ccaaccacat tactctgaa 3120
cttctgggcc agccagcagc gatcaactaca ctgagcccta tgggctcagg agcagcccca 3180
ttcagagagc ctctctccca ggtgctgccc tccagctcac aggcctgccc tccagcacc 3240
tgaagatgct gttgataag tctctcttac caagtgtgtg atggctgccc catggtggg 3300
cctggacagc ttgtgtgtcc tgotgagctg tccactgtc ggaagactgt ttaagaagc 3360
tcaittttgc ctctccgcca actgtcttca gaaaacctat taggttaggt gatacgtgc 3420
cagcaaggga agcaccatg tccagatct gcaaatctgg ttctgtggaa ccccaagctc 3480
ctcagcagat ctggctgtac atggatcaga accactcttt ccccctgta agctgtgtgt 3540

```

WO 02/29055

PCT/US01/30591

```

tgaccaaggt gtcagcatal aggaactgct gctgcattta atgaagggtt ttccttttgg 3600
aagctctgtg taccctctgc gccatgttgg gaggagacat ccatctggtc tgggatltcg 3660
ggagttagaa tggaaagctc ttltgtaaa actggagta tccctggctg ccaactgggt 3720
gttcagagcc ggacgggctt gttttggaca tcaactgttc ctctactcag cagccacggg 3780
agagtgtccc ccatgcaact ccaacttaga aaccactgca gatactgagt agcttgcctg 3840
ctcctggaaa ctctcgtttt ttgttagtat cataatgaag gcaaaagaaa ctaggctgtc 3900
atcttcaagc ctctttgact tactctagat gttgggagca gtgggtgcca ggtgaaacct 3960
gggccccttg tctttttcac caatgcttgg gcaatltctg tatccagaga gtcccaaggt 4020
tcagataaag tgaagaagag taatagaaca gcaaaaggag tggcttgag gatgtgctag 4080
taagccctgt ggtttgtgct baggtctctg ctctgtacc caaggaactg gtggttcagc 4140
tggagataaa aagaagaatt tgcgaagta gagaagaac cccaaccccg gaaatcctc 4200
tgcctccagc ctctggaggt gaagcaggga caataagcta aggtagtatc ttggccatcc 4260
caggaactct gtggcattag gacgatgaag gccatgctc agtgttttcg ttctatltc 4320
atgagacttt ttgtctctc gcttacaagt gggaaagatg ttgacagtga ctctactatg 4380
cagggctgtt ggtaccaacc tgaagcctat aggtggcagt ccttgagaaa gtgtcaacag 4440
aagatggagc tctgatccc tgcctacctc ttcacaacac ttgtgtgcaa agatagtitt 4500
agatttggtt tagaagctat cctccagaac aggtcccat acttagaatg tttctagtta 4560
aggtataaaa ttaggcaacc caagtgtgac tccactcaag tgtccttttc tgtaggcagg 4620
aagggcccac aacatggctt aaaaatgtagt ccaatggtct gcccacagc acagtgtgta 4680
tctataccag gtaacctgtg ttcaatctgg gagccttctc ggcagctcty agtggcagcc 4740
agaagggagc tcatagtgtc tagaggtctc aggcaaggtg ggtcagggta ctgtggcag 4800
ggggatgtg tgtgatagga gagggtccct aaacct 4836

```

```

<210> 4
<211> 3239
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 2369534CB1

```

```

<400> 4
taagctggcg acggcctttt tttttttttt tttttttttc acactgcaaa 60
acaacttttt atttaaaagg ccaataatga gaataatgag ttgcaacaaga atgaaacct 120
tatccctccc aaaaagctgg cctatacatt atgtataaag ttagaataat tctaataca 180
aaatgcacaa gccacagggg tccaactcct cctctctaa gccatcttga cagtttcaaa 240
tttcagcttc cagacgtcat ttctgtgtct ttaaggggtg cttaaccagc cgtggctgtg 300
accagacagc gtatgtggca cagcgttagc actgccagca ggccttggg agcttggcga 360
gggtgggagc ttgagaaata gctggctcgg accatggcgy gggtttgtgt gtcaactccc 420
tggctctcag agaatccgag ccacgggaga gcaaacgctg ctccaaaac caaaggagga 480
attttgcant cgtttagagc ggttataata gaatctcaat cagatcttga aggttatcgy 540
tgccttctgc aggtttttat tctcaaaaa tgcagccaag ctttgctgtg ctatctctgg 600
tggatctgag ctaggttggt ctatcttttc ctaattcaat tgcctttttt ttgcaaggaa 660
gggggtttct ggtccatcgg agggatacaag ggcattgctc tcaagtctcg tcaggagaaa 720
aaaatagaca ttcagcagac agaccacagc cagcgtatgc gaccagcctc gtttggctat 780
tttagctctc tcttaataca cagacaacag agcaagaaa aagctacttt gtccaaacc 840
gggcccctgg ttggagttta gccctgcttg gctctgccc ctagtctcag tcaagtcact 900
caccocagge ctggcgaac ggtggctctg ttggtctctc ctggcctctc caactctctt 960
gccttgtggg gaaccaccaa gccctctccc gacttgccca gaggctgeac gcctctctgg 1020
catcaacagc cgcacaggag ctggctgtaa gactccaactg aaatcccccc ggcctggctg 1080
tcgtgccca ggcacacca cctcaactct gecttlltc tgetggtttc tggcctgttt 1140
ggtccagccc cctcctgca ctctctccgc agctgtctgg tgggtgatgt gaaccaaggy 1200
acaccagggc tcaatggcact gcctggatc agtttggtaa tctgtggcag tctgtccctg 1260
gcttctgagc ctggggctc ctctctcttc tccccactc ggtgagcag gacacgctgy 1320
ggagacagcg tctcaaaaag gccctcaag agctgtgccc tgtgccagga aagcctcctg 1380
tatttccaa gattgtccctg gagccctcca gctgggtcct ctgctgaggt ctgtgacag 1440
cgggaaatagg cctctagggg aggggttggg gacaggcctc taggggagaa cacacctccg 1500
ggtaactgac ctgtggctca ccagccact gacagggccc agcttcaagc tcaagatgtg 1560
cagctcaacg gaactgactg ctgtcaacac agtgggcca ggcctggag actgaactct 1620
cctgtggctg cttgtttaa gggcatggga tagagaaaga gtgtgttatt ttaaagctgg 1680
actacctaac agcctctgat agcagataca gctttgtcgc tgttcttgaa gttcaagsgt 1740
atgtggaggt gttgcagtga caatcagta accgtgaaca acaactgcca ccaactgca 1800

```

WO 02/29055

PCT/US01/30591

```

ccctgaagtg gtatagggg cctgcttgg cacttgacg tggggcagga gtcccttct 1860
tggggactca ctctctactt cgtctcccc gggagtgtg tactttccta ggccctgcca 1920
gcagccccc cagctccgcc cagcccactc caccagcttg ctgctcccat ggctcagccc 1980
cactcacagc tcacccctcc catggctagg ccccatccac agctcaccoc tcccatgact 2040
aggcccccgc cacagctcac ctctcccgty actaggcccc gccccacagt cacctttccc 2100
atggctaggc cctgtccaca gctcaaccca cccatagcta gccccattca cagctcacct 2160
ctcccattgg taggcccac ccacagctcg ccccgccac agctcaccoc tcccatgact 2220
aggcccccgc cacagctcac cctcccatg gctccatggg ctctctctcc cctctgct 2280
aagtccccgc agggccagaa cccctggccc ccaggccctg gggccgtggg caaggaggcc 2340
tctccgcttg gtactgtctc catggaacaa aaccacactg cagcgttcca ggaccacaga 2400
acagccaggc aggtgttacc cagcaaaagg gactggtgac cagcactgga cactgggat 2460
cagctgaaga cactggcttg agaatgcat gccatttacc cagcagctt caagatggat 2520
gctggctttt aaaagagcag cccagctgca ccagaggaca tggcggttta tgtatggaac 2580
attggcctcc aagcctgagg caggaaagcc ctctccatgc ctgtaaccca aagctctagg 2640
ccactggctc ccaagagtga gcactcccc caagaaacag ctlggtttaa caagtgggag 2700
cagctgccac aagagaacgg aggtctccc ccagcaatg tgcaggtgtc tcactttctc 2760
agggtttctg aggtggactg gctcctagga cctgaagctt tgagctggca agcagtccc 2820
acggagctcg gctgtaaggc tccactgaaa tccccccggc gctggttcg tgcaccaggc 2880
acacccactc cactttgccc tcttttctgc tggtttctgg cctggttggg cccagcccct 2940
ccctgcactc tctccgcagc tgtctggtgg gtgctgtgaa ccaagggaca cccagggtca 3000
tggactgccc tggattcagt ttggtaatg tggcggtct gtcctgggt tctgagctg 3060
ggcctctcct ctctttctcc ccatcctgga tgagcaggac acgtgggga gacagctcc 3120
taaaaaggcc tcctaagagc tgtccctgt gccaggaag cctctgtat ctccaagat 3180
gtcctggag ccctccagct ggtgctctg ctgaggtctg tgagcagcg gaataggc 3239

```

【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
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/029055 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, C07K 16/18, C12Q 1/68, A61K 38/16, 39/395, G01N 33/50, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US01/30591
- (22) International Filing Date: 1 October 2001 (01.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/237,456 2 October 2000 (02.10.2000) 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): TANG, Y., Tom [US/US]; 4250 Ramnick Court, San Jose, CA 95118 (US); ELLIOTT, Vicki, S. [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US); YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US); LAL, Preeti [IN/US]; P.O. Box 5142, Santa Clara, CA 95056 (US); WALIA, Narinder, K. [US/US]; 890 David Street, #205, San Leandro, CA 94577 (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, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
14 August 2003
- 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 02/029055 A3

(54) Title: CARBOHYDRATE-ASSOCIATED PROTEINS

(57) Abstract: The invention provides human carbohydrate-associated proteins (CARBAP) and polynucleotides which identify and encode CARBAP. The invention also provides expression vectors, host cells, antibodies, agonists, and antagonists. The invention also provides method for diagnosing, treating, or preventing disorders associated with aberrant expression of CARBAP.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US 01/30591
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N5/10 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/16 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE T ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XVII THE COMPLETE SEQUENCES OF 150 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 7, 28 February 2000 (2000-02-28), pages 65-73, XP000949814 ISSN: 1340-2838 the whole document	1-59
X	WO 99 38881 A (ENDRESS GREGORY A ; FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 5 August 1999 (1999-08-05) see whole doc. esp. claims and se id 54 -/-	1-59
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document relating 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 19 November 2002		Date of mailing of the international search report 12.03.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Mueller, F

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PC1/US 01/30591

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! hypothetical protein KIAA1310, 1 October 2000 (2000-10-01) retrieved from SWALL Database accession no. q9p2n6 XP002221543 abstract	1-59
X	DATABASE EMBL 'Online! hypothetical protein, 1 October 2000 (2000-10-01) retrieved from SWALL Database accession no. q9nwe5 XP002221544 abstract	1-59
X	NAGASE ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCE OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XIII. THE COMPLETE SEQUENCE OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODE FOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, vol. 6, 1999, pages 63-70, XP000952912 ISSN: 1340-2838 see whole doc.	1-59
E	WO 02 22815 A (HYSEO INC ;TANG Y TOM (US)) 21 March 2002 (2002-03-21) see whole doc. esp. seq id 418	1-59

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/30591
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
	Although claims 19,33,35. are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	21,22,24,25
	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
	see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
	1-59 partially
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01 80591

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 21,22,24,25

Present claims 21,22,24,25, relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely binding to seq id 1 or seq id 2.

The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. 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. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, no search has been carried out.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an international Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01 80591

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-59 (partially)

seq id 1 and seq id 3 and thereon defined subject-matter as claimed in claims 1-59.

2. Claims: 1-59 (partially)

seq id 2 and seq id 4 and thereon defined subject-matter as claimed in claims 1-59.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/30591

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9938881 A	05-08-1999	AU 2471899 A	16-08-1999
		CA 2319129 A1	05-08-1999
		EP 1051426 A1	15-11-2000
		JP 2002501738 T	22-01-2002
		WO 9938881 A1	05-08-1999
WO 0222815 A	21-03-2002	AU 8902701 A	26-03-2002
		AU 9054801 A	26-03-2002
		WO 0222660 A2	21-03-2002
		WO 0222815 A1	21-03-2002
		WO 0222780 A2	21-03-2002

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 3/10	A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 5
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/02	A 6 1 P 9/02	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 13/02	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 19/10	
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 25/08	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
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 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
C 0 7 K 1/22	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
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 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
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 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, 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, EC, 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 エリオット、ビッキー・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・ポルトンプレイスウェイ 3 7 7 0
- (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 ・サニーバイル・ルイスアベニュー 8 2 6
- (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 チョーラ、ナリンダー・ケイ
 アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 8 7 ・ユニオンシティ・# 7 1 2 ・ユニオンスクエア 3
 3

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37
 DA77 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA06 EA03 EA04 HA01 HA04
 HA14
 4B029 AA07 BB20 CC03 FA15
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ42 QR32 QR55 QR82 QS34 QS36 QX02
 4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE13 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA01 AA07 AA17 BA22 BA34 CA56 CA59 MA52 MA55 NA14
 ZA011 ZA031 ZA161 ZA331 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZA971 ZB071
 ZB111 ZB131 ZB261 ZB271 ZB331 ZB351 ZC351 ZC551 ZC781
 4C085 AA13 AA14 DD22 DD23 EE01 GG01 GG08
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74
 GA20

专利名称(译)	糖结合蛋白		
公开(公告)号	JP2004528009A	公开(公告)日	2004-09-16
申请号	JP2002532625	申请日	2001-10-01
[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	タングワイトム エリオットビッキーエス ユエヘンリー ラルプリーティ チョーラナリンダーケイ		
发明人	タング、ワイトム エリオット、ビッキー・エス ユエ、ヘンリー ラル、プリーティ チョーラ、ナリンダー・ケイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25 /00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1 /00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1 /68 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/02 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P27 /02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/02 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/00 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/08 A61P25/16 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P31 /12 A61P31/18 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 C07K1/22 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045 /DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024 /HA04 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063 /QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE13 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084 /BA22 4C084/BA34 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA031 4C084/ZA161 4C084/ZA331 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC351 4C084/ZC551 4C084/ZC781 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA20		

优先权

60/237456 2000-10-02 US

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码CARBAP的人碳水化合物相关蛋白 (CARBAP) 和多核苷酸。本发明还提供表达载体，宿主细胞，抗体，激动剂和拮抗剂。本发明还提供了用于诊断，治疗或预防与CARBAP的异常表达有关的疾病的方法。