(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2005-500814
(P2005-500814A)
(43)公表日　平成17年1月13日(2005.1.13)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	2G045
A61K 38/00	A61K	39/395	D	4B024
A61K 39/395	A61K	39/395	N	4B050
A61K 45/00	A61K	45/00		4B063
A61K 49/00	A61K	49/00	Z	4B064

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 187 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-559573(P2002-559573)
(86)(22)出願日　平成13年12月18日(2001.12.18)
(85)翻訳文提出日　平成15年6月12日(2003.6.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/049212
(87)国際公開番号　WO2002/059286
(87)国際公開日　平成14年8月1日(2002.8.1)
(31)優先権主張番号　60/257,193
(32)優先日　平成12年12月19日(2000.12.19)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/260,111
(32)優先日　平成13年1月5日(2001.1.5)
(33)優先権主張国　米国(US)

(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
(74)代理人　100089266
弁理士　大島　陽一
(72)発明者　ボーグン、マライア
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４５７７・サンレアンドロ・サンティアゴロード　１４２４４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼ

(57)【要約】
本発明はヒトアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼ（ＡＤＧＵＣ）およびＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣの異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の（ａ）乃至（ｄ）からなる群から選択した単離されたポリペプチド。
（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２（配列番号１乃至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
（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％が同一であるような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
（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
【請求項２】
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、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）からなる群から選択したポリヌクレオチド配列を含む、請求項４に記載の単離されたポリヌクレオチド。
【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、
（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したプロモーター配列を持つ組換えポリヌクレオチドで形質転換される細胞を培養する過程と、
（ｂ）そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程とからなり、前記組換えポリヌクレオチドが、請求項１に記載の前記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含むことを特徴とする方法。
【請求項１０】
前記ポリペプチドが、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（ｅ）からなる群から選択した単離されたポリヌクレオチド。
（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：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％が同一であるような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
（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持つ少なくとも２０の連続したヌクレオチドを持つプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程と、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドあるい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、プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズすることを特徴とする過程と、
（ｂ）前記ハイブリダイゼーション複合体の有無を検出し、該複合体が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程、とを含む方法。
【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）前記の増幅した標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含むことを特徴とする方法。
【請求項１７】
請求項１のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含むことを特徴とする組成物。
【請求項１８】
前記ポリペプチドが、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ことを特徴とする請求項１７の組成物。
【請求項１９】
機能的なＡＤＧＵＣ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。
【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組成物。
【請求項２２】
機能的なＡＤＧＵＣ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。
【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組成物。
【請求項２５】
機能的なＡＤＧＵＣ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、
（ａ）請求項１のポリペプチドを適切な条件下で少なくとも１つの試験化合物に混合させる過程と、
（ｂ）請求項１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のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程を含む方法。
【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、
（ａ）請求項１のポリペプチドの活性が許容される条件下で、請求項１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のポリペプチドの活性と比較する過程を含み、試験化合物の存在下での請求項１のポリペプチドの活性の変化が、請求項１のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示するような方法。
【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、
（ａ）前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、該標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
（ｂ）前記標的ポリヌクレオチドの発現改変を検出する過程と、
（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）処理した前記生物学的サンプルの核酸と、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持つプローブをハイブリダイズさせる過程であって、このハイブリダイゼーションゼーションが、前記プローブと前記生物学的サンプル中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またはその断片のポリヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドである、前記過程と、
（ｃ）ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量する過程と、
（ｄ）前記処理された生物学的サンプル中の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ような方法。
【請求項３０】

生物学的サンプル中のＡＤＧＵＣの発現に関連する症状または疾患に対する診断試験法であって、
（ａ）前記生物学的サンプルと請求項１１の抗体との混合を、前記抗体が前記ポリペプチドに結合し、抗体とポリペプチドとの複合体を形成するのに適した条件下で行う過程と、
（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３１】
前記抗体が、
（ａ）キメラ抗体
（ｂ）単鎖抗体
（ｃ）Ｆａｂ断片
（ｄ）Ｆ（ａｂ’）$_2$ 断片
（ｅ）ヒト化抗体、のいずれかである抗体。
【請求項３２】
請求項１１に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む組成物。
【請求項３３】
被検者のＡＤＧＵＣ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３２に記載の組成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３４】
前記抗体が標識されることを特徴とする請求項３２に記載の組成物。
【請求項３５】
被検者のＡＤＧＵＣ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３４に記載の組成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３６】
請求項１１に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、
（ａ）抗体反応を誘発する条件下で、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチド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前記ポリペプチドでスクリーニングし、それによって、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２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に特異結合するポリクローナル抗体を同定する過程とを含むような方法。
【請求項３７】
請求項３６に記載の方法で産出したポリクローナル抗体。
【請求項３８】
請求項３７に記載のポリクローナル抗体及び適切なキャリアーを含む組成物。
【請求項３９】
請求項１１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、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２からなる群から選択したアミノ酸配列またはその免疫原性断片を含むポリペプチド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）前記抗体産出細胞と不死化した細胞とを融合して、モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞を形成する過程と、
（ｄ）前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、
（ｅ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２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に特異結合するようなモノクローナル抗体を前記培養物から単離する過程とを含むことを特徴とする方法。
【請求項４０】
請求項３９に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項４１】
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ーを含む組成物。
【請求項４２】
Ｆａｂ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】
サンプル中の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を検出する方法であって、
（ａ）請求項１１に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と１サンプルとをインキュベートする過程と、
（ｂ）特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２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がサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。
【請求項４５】
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を精製する方法であって、
（ａ）請求項１１に記載の抗体と前記ポリペプチドとの特異結合を許容する条件下で、前記抗体と１サンプルとをインキュベートする過程と、
（ｂ）前記サンプルから前記抗体を分離し、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２からなる群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程、とを含むことを特徴とする方法。
【請求項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発現プロファイルを作製する方法であって、
（ａ）サンプル中のポリヌクレオチドを標識化する過程と、
（ｂ）ハイブリダイゼーション複合体が形成されるのに適した条件下で請求項４６のマイクロアレイのエレメントとサンプル中の標識化ポリヌクレオチドとを接触させる過程と、
（ｃ）サンプル中のポリヌクレオチドの発現を定量する過程とを含む方法。
【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。
【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。

【請求項５２】
請求項４８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５３】
請求項４８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含む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５４】
請求項４８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５５】
請求項４８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。
【請求項５６】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１のアミノ酸配列を含む請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５７】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２のアミノ酸配列を含む請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５８】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３のポリヌクレオチド配列を含む請求項１２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項５９】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４のポリヌクレオチド配列を含む請求項１２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、アデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼの核酸配列及びアミノ酸配列に関する。 本発明はまた、これらの配列を利用した神経系疾患、心血管系疾患、視覚系疾患、生殖系疾患、平滑筋疾患、及び細菌感染の診断・治療・予防に関する。 本発明はさらに、アデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外因性化合物の効果についての評価に関する。
（発明の背景）
セカンドメッセンジャー分子は、細胞内シグナル伝達経路内での必須の役割を果たす。それは表面受容体にリガンドが結合すると活性化する媒介であり、下流エフェクター分子の活性剤として働く。サイクリックヌクレオチド、アデノシン３’、５’－サイクリック一リン酸（ｃＡＭＰ）及びグアノシン３’、５’－サイクリック一リン酸 （ｃＧＭＰ）は、多様なシグナル伝達経路における重要なセカンドメッセンジャーである。ｃＡＭＰおよびｃＧＭＰはＡＴＰとＧＴＰの酵素であるアデニリル（アデニル酸）シクラーゼ（ＡＣ）とグアニリル（グアニル酸）シクラーゼ（ＧＣ） により生成される。従って細胞内のｃＡＭＰおよびｃＧＭＰレベルを調節する重要なステップは、ＡＣおよびＧＣ活性の調節である。
【０００２】
既知の哺乳動物ＡＣのアイソフォームには９つある。すべては小さな細胞質内Ｎ末端ドメイン（Ｎ）、さらに６つの推定αヘリックス（M_1）を有する膜貫通ドメイン、大きな細胞質内ドメイン（C_1）、第２の膜貫通螺旋クラスタ（M_2）および第１の細胞質内ドメインに相同的な第２細胞質内ドメイン（C_2）から成る共通の構造を共有している （Ｓｉｍｏｎｄｓ，Ｗ．Ｆ．（１９９９）Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．２０：６６－７３）。C_1 およびC_2 ドメインは約２３０ アミノ酸領域（C_{1a} および

C_{2a}）を含み、これらの領域は約４０％の同一性を共有し、また酵素の触媒中心を形成する。細胞質内ドメインの残りの部分は、C_{1b}とC_{2b}として知られる。C_{1a}およびC_{2a}ドメインの３次構造は、三層のα／βサンドイッチからなる。C_{1a}およびC_{2a}ドメインは花輪のように同じ方向を向いた列を作る配列される（Ｔａｎｇ，Ｗ．－Ｊ及びＪ．Ｈ．Ｈｕｒｌｅｙ（１９９８）Ｍｏｌ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．５４：２３１－２４０）。すべての既知のＧＣ触媒ドメインは哺乳動物ＡＣのC_1とC_2領域に相同的であり、いくつかの研究によると同じ構造を共有することが示唆される。膜貫通ＧＣは、各タンパク質に１回の膜貫通交差および１つの触媒ドメインタンパク質を含み、ホモ二量体として機能する。可溶性ＧＣは、αおよびβサブユニットの各々により寄与された１つの触媒ドメインを有し、αおよびβサブユニットのヘテロ二量体として機能する。ロイシンリピート配列もＡＣおよびＧＣポリペプチドの特徴である（Ｆｉｅｌｄ，Ｊ．他（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４７：４６４４６７およびＭｅｌｃｈｉｏｒ，Ｆ．他（１９９３）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｃｅｌｌ．４：５６９５８１）。

【０００３】

哺乳動物ＡＣは、Ｇタンパク質、Ca^{2+}シグナルおよびリン酸化による複雑な調節を受ける（前出のＴａｎｇ）。C_{1a}は抑制性Ｇタンパク質のαサブユニット（$G_{i\alpha}$）の主要な結合部位である。C_{2a}は刺激性Ｇタンパク質αサブユニット（$G_{s\alpha}$）と$G_{\beta\gamma}$，の主要な結合部位であり、プロテインキナーゼ（ＰＫ）Ｃとカルモジュリン（ＣａＭ）キナーゼＩＩのリン酸化部位を含む。C_{1b}はCa^{2+}／ＣａＭ、Ca^{2+}、ＰＫＡおよびＣａＭキナーゼＩＶによる調節のための部位である（Ｔｅｓｍｅｒ，Ｊ．Ｇ．Ｇ及びＳ．Ｒ．Ｓｐｒａｎｇ（１９９８）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．８：７１３－７１９）。９つのＡＣアイソフォームの発現パターンと他の調節特性は多種多様である。例えば、ＡＣ４、ＡＣ７、ＡＣ９は様々な組織で発現するが、ＡＣ１とＡＣ８は神経組織でのみ発現する。そしてＡＣ５は主に心臓と脳で発現する（前出のＳｉｍｏｎｄｓ）。すべてのＡＣアイソフォームは$G_{s\alpha}$により活性化するが、$G_{i\alpha}$または$G_{\beta\gamma}$ファミリーのサブユニットに示差反応を示す。またＰＫｓ、Ca^{2+}、ＣａＭに対して可変感度を示す。例えば、ＡＣ５とＡＣ６はＣａＭ非依存性の方法でCa^{2+}のサブミクロモル濃度により抑制されるが、ＡＣ１、ＡＣ３、ＡＣ８はCa^{2+}／ＣａＭにより強く刺激を受ける。ＡＣ３、ＡＣ５およびＡＣ６はG_{i1}による抑制に対する感受性を有するが、ＡＣ２はそうではない。この異質性により、Ｇタンパク質により伝送されたシグナルを細胞内のCa^{2+}レベルとＰＫＣ活性に影響する他の源泉からのシグナルとを統合して、細胞外シグナルに対する組織特異的反応および細胞特異的反応を示すことを可能にする（前出のＳｉｍｏｎｄｓ）。

【０００４】

アデニリルシクラーゼは、ホルモン、神経伝達物質、臭気物質およびケモカインの細胞内シグナル伝達経路における重要な存在である（前出のＴａｎｇ）。ｃＡＭＰは、様々な細胞型における特異的な酵素の活性を変更するｃＡＭＰ依存性プロテインキナーゼを活性化する。サイクリックヌクレオチド依存性イオンチャネルを活性化することにより、ｃＡＭＰは細胞膜電位に影響を及ぼすことができる。ｃＡＭＰは多様な組織特異的影響をも有する。ｃＡＭＰのレベルの上昇によって、脂肪組織でのトリグリセリド加水分解の増加とアミノ酸吸収の減少、肝臓でのグリコーゲンからグルコースへの変換の増大、グリコーゲン合成の阻害、糖新生の増大、卵胞でのエストロゲンとプロゲステロンの合成の増大、副腎皮質でのアルドステロンとコルチゾールの合成の増大、心筋細胞での収縮速度の上昇、骨格筋でのグリコーゲンからグルコースへの変換、甲状腺でのサイロキシンの分泌、骨及び骨細胞からのカルシウムの再吸収、腸での液分泌、腎臓での水分再吸収、血小板における凝集と分泌の阻害を引き起こす。（Ｌｏｄｉｓｈ，Ｈ．他（１９９５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｂｏｏｋｓ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，８７１，８７９８８６ページを参照）。脳で発現するＣａＭ調節性ＡＣは、学習及び記憶の他にシナプス可塑性においても重要である。ＡＣ１はメラトニン合成の調節に役割を果たしている可能性もある（Ｘｉａ，Ｚ及びＤ．Ｒ．Ｓｔｏ

ｒｍ（１９９７）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ．７：３９１－３９６）。

【０００５】

膜ＧＣはアミノ末端で細胞外リガンド結合ドメインを有する。その既知のリガンドには、ナトリウム利尿ペプチドと細菌性エンテロトキシンが含まれる。ノックアウトしたマウスを使った実験では、ＧＣ－Ａは心臓機能および発達において役割を果たすことが明らかになった。ヒトの先天的失明の状態はＧＣ－Ｅの突然変異に関係がある。ＧＣ－Ｇは骨格筋において高度に発現する。またＧＣ－Ｇは血流の調節に役割を果たす可能性がある（Ｗｅｄｅｌ，Ｂ．Ｊ及びＤ．Ｌ．Ｇａｒｂｅｒｓ（１９９８）Ｔｒｅｎｄｓ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．９：２１３－２１９）。可溶性グアニリルシクラーゼはヘムと結合しており、一酸化窒素により活性化される。一酸化窒素可溶性グアニリルシクラーゼｃＧＭＰ経路は哺乳動物組織においてよく見られ、非血管系平滑筋また血管系平滑筋の弛緩、周辺及び中枢の神経伝達、血小板反応性、光伝達を含む数々の生理的プロセスを仲介する面で重要である。一酸化窒素－可溶性グアニリルシクラーゼ－ｃＧＭＰ経路の過度な活動には、敗血ショックと片頭痛と関連がある可能性がある。また経路の低水準の活動にはインポテンス、高血圧、喘息と関連がある可能性がある（Ｈｏｂｂｓ，Ａ．Ｊ．（１９９７）Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．１８：４８４－４９１）。

【０００６】

ＡＣの既知のインヒビターには、降圧剤フォルスコリンとＰ部位インヒビターがある。求められる特異性が達成可能な場合、心臓特有のＡＣインヒビターは鬱血性心不全の治療に有用であると提案されてきた。コレラその他の重症の下痢は細菌毒素による胃腸のＡＣとＧＣの活性に起因するので、酵素ＡＣとＧＣは有用な治療標的ともなる（Ｄｅｓｓａｕｅｒ，Ｃ．Ｗ．他（１９９９）Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．２０：２０５－２１０）。

【０００７】

新たなアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼ及びこれらをコードするポリヌクレオチドの発見は、神経系疾患、心血管系疾患、視覚系疾患、生殖系疾患、平滑筋疾患、及び細菌感染の診断、予防並びに治療において、またアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼの核酸及びアミノ酸配列の発現に対する外因性化合物の効果の評価において有用であるような新たな組成物を提供することにより、当分野における必要性を満たす。

（発明の概要）

本発明は、総称して「ＡＤＧＵＣ」、個別にはそれぞれ「ＡＤＧＵＣ－１」および「ＡＤＧＵＣ－２」と呼ぶアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼである精製されたポリペプチドを提供する。或る実施態様において本発明は、（ａ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２からなる群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、（ｂ）ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２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、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。

【０００８】

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含むポリペプチド、（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からなるポリペプチド、（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からなる群から選択したポリペプチドをコードする

。別の実施態様では、ポリヌクレオチドはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４を有する群から選択される。

【０００９】

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含むポリペプチド、（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。

【００１０】

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含むポリペプチド、（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。

【００１１】

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含むポリペプチド、（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。

【００１２】

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。

【００１３】

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。

【００１４】

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）前記の増幅した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。

【００１５】

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組成物を提供する。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含むポリペプチド、（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からな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から選択される。一実施例では、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。 更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的ＡＤＧＵＣの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【００１６】

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含むポリペプチド、（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）ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、（ｂ）サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的ＡＤＧＵＣの発現の低下に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【００１７】

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含むポリペプチド、（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組成物を提供する。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ＡＤＧＵＣの過剰な発現に関連した疾患やその症状の治療方法を提供する。

【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含むポリペプチド、（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、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。

【００１９】

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含むポリペプチド、（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％の相同性を有す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、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されたポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。 スクリーニング方法は、（ａ）ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも１つの試験化合物と混合させる過程と、（ｂ）ポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、（ｃ）試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下で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。

【００２０】

本発明は更に、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４からなる群から選択されたポリヌクレオチド配列を含む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を提供する。標的ポリヌクレオチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４からなる群から選択した配列を含む。スクリーニング方法は、（ａ）標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、（ｂ）標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、（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。

【００２１】

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。

（発明を実施するための形態）

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

【００２２】

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。

【００２３】

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。

（定義）

用語「ＡＤＧＵＣ」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ＡＤＧＵＣのアミノ酸配列を指す。

【００２４】

用語「アゴニスト」は、ＡＤＧＵＣの生物学的活性を強めたり、模倣する分子を指す。このアゴニストは、ＡＤＧＵＣに直接相互作用するか、或いはＡＤＧＵＣが関与する生物学的経路の成分と作用して、ＡＤＧＵＣ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。

【００２５】

「対立遺伝子変異体」は、ＡＤＧＵＣをコードする遺伝子の別の形態である。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。

【００２６】

ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣと同じポリペプチド或いはＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体の遺伝子座ではない位置での対立遺伝子変異配列との不適当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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、セリンとトレオニンがある。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。

【００２７】

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。

【００２８】

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。

【００２９】

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

【００３０】

「抗体」の語は、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Ｆａ、Ｆ（ａｂ’）２ 及びＦｖ断片を指す。ＡＤＧＵＣ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ー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（ＫＬＨ）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。

【００３１】

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。

【００３２】

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 Ｌｉｇａ

ｎｄｓ ｂｙ ＥＸｐｏｎｅｎｔｉａｌ Ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔの略、試験管内選択法））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、ヌクレオチド誘導体、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’－NH_2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、たとえば光活性化または架橋剤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。）

「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、ワクシニアウィルスに基づく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）。

【００３３】

「ｓｐｉｅｇｅｌｍｅｒ」の語はＬ－ＤＮＡ、Ｌ－ＲＮＡその他の左旋性ヌクレオチド誘導体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。

【００３４】

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結合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」という表現はある参考ＤＮＡ分子のセンス鎖を意味する。

【００３５】

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ＡＤＧＵＣ、合成のＡＤＧＵＣ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。

【００３６】

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－Ｔ３’」は、相補配列「３’Ｔ－Ｃ－Ａ５’」と対を形成する。

【００３７】

３’－ＴＣＡ－５’．［ｔｒａｎｓｌａｔｏｒ’ｓ ｎｏｔｅ（Ｍｉｋｉｏ）：ｔｈｉｓ ｂｅｌｏｎｇｓ ｔｏ ｔｈｅ ｐｒｅｖｉｏｕｓ ｓｅｎｔｅｎｃｅ．Ｉ ｄｏｎ’ｔ ｋｎｏｗ ｈｏｗ ｔｏ ｇｅｔ ｒｉｄ ｏｆ ｔｈｅ ｓｅｐａｒａｔｉｎｇ ｔａｇ．］

「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。この組成物には、乾燥製剤または水溶液が含まれ得る。ＡＤＧＵＣ若しくはＡＤＧＵＣ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。

【００３８】

「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、再度シークエ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オーバーラップする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。

【００３９】

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できて、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, Se r
Arg	His, Lys
Asn	Asp, Gln, His
Asp	Asn, Glu
Cys	Ala, Ser
Gln	Asn, Glu, His
Glu	Asp, Gln, His
Gly	Ala
His	Asn, Arg, Gln, Glu
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	His、Met、Leu、Trp、Tyr
Ser	Cys、Thr
Thr	Ser、Val
Trp	Phe、Tyr
Tyr	His、Phe、Trp
Val	Ile、Leu、Thr

【００４０】
保存アミノ酸置換では通常、（ａ）置換領域におけるポリペプチドのバックボーン構造、例えばβシートやα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。
【００４１】
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。
【００４２】
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

。
【００４３】
「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。
【００４４】
「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。
【００４５】
「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。
【００４６】
「断片」は、ＡＤＧＵＣまたはＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの固有部分であって、親配列と同一配列であるが親配列よりも長さが短い配列を指す。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選択的に選択し得る。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。
【００４７】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４の断片には、固有のポリヌクレオチド配列領域が含まれる。この領域は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４を特異的に同定するものであり、例えばこの断片を得たゲノム中のその他の配列とは異なるものである。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。
【００４８】
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 のある断片には、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。 例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２ のある断片は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２を特異認識する抗体を産出するための免疫原性ペプチドとして有用である。 ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２ のある断片の正確な長さ、及びその断片に対応するＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１－２ 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。
【００４９】
「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。
【００５０】
「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。

【００５１】
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。
【００５２】
ポリヌクレオチド配列間の一致率は、ＭＥＧＡＬＩＧＮ ｖｅｒｓｉｏｎ ３．１２ｅ配列アラインメントプログラムに組込まれているようなＣＬＵＳＴＡＬ Ｖアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、ＬＡＳＥＲＧＥＮＥ ソフトウエアパッケージ（一組の分子生物学的分析プログラム）（ＤＮＡＳＴＡＲ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）の一部である。このＣＬＵＳＴＡＬ Ｖは、Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．及びＰ．Ｍ．Ｓｈａｒｐ（１９８９）ＣＡＢＩＯＳ ５：１５１－１５３、Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｄ．Ｇ．他（１９９２）ＣＡＢＩＯＳ ８：１８９－１９１に記載されている。ポリヌクレオチド配列をペアワイズでアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ｋｔｕｐｌｅ＝２、ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｙ＝５、ｗｉｎｄｏｗ＝４、「ｄｉａｇｏｎａｌｓ ｓａｖｅｄ」＝４と設定する。「重み付けされた」残基重み付け表が、デフォルトとして選択された。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。
【００５３】
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直接のペアワイズで比較するために用いられる。「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｏｒｆ／ｂ１２．ｈｔｍｌ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ために、デフォルトパラメータとして設定された「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２（２０００年４月２１日）を用いてｂｌａｓｔｎを実行してもよい。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。
Ｍａｔｒｉｘ：ＢＬＯＳＵＭ６２
Ｒｅｗａｒｄ ｆｏｒ ｍａｔｃｈ： １
Ｐｅｎａｌｔｙ ｆｏｒ ｍｉｓｍａｔｃｈ： －２
Ｏｐｅｎ Ｇａｐ：５ 及びＥｘｔｅｎｓｉｏｎ Ｇａｐ：２ ｐｅｎａｌｔｉｅｓ
Ｇａｐ ｘ ｄｒｏｐ－ｏｆｆ： ５０
Ｅｘｐｅｃｔ： １０
Ｗｏｒｄ Ｓｉｚｅ： １１
Ｆｉｌｔｅｒ：ｏｎ
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。

【００５４】

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。

【００５５】

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。

【００５６】

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ペアワイズ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。

【００５７】

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ペアワイズで比較をする場合、ある者は、デフォルトパラメータで設定された「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．１２（Ａｐｒ－２１－２０００）でｂｌａｓｔｐを使用するであろう。デフォルトパラメータの設定例を以下に示す。

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。

【００５８】

「ヒト人工染色体（ＨＡＣ）」は、約６ｋｂ ～１０Ｍｂ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要素を含む直鎖状の微小染色体である。

【００５９】

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。

【００６０】

「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補性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合（即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合）が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定できる。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×ＳＳＣ、約１％（ｗ／ｖ）のＳＤＳ、並びに約１００μｇ／ｍｌのせん断して変性したサケ精子ＤＮＡが含まれる。

【００６１】

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（Ｔｍ）より約５～２０℃低くなるように選択する。このＴｍ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。Ｔｍ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。

【００６２】

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０．２ｘ ＳＳＣ及び約１％のＳＤＳの存在の下、約６８℃で１時間の洗浄過程を含む。別法では、６５℃、６０℃、５５℃、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ハイブリダイゼーションを阻止する。このようなブロッキング剤には、例えば、約１００～２００μｇ／ｍｌの変性サケ精子ＤＮＡがある。特定条件下で、例えばＲＮＡとＤＮＡのハイブリダイゼーションに有機溶剤、例えば約３５～５０％ｖ／ｖの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

【００６３】

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（C_0tまたはR_0t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。

【００６４】

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。

【００６５】

「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。

【００６６】

「免疫抗原性断片」とは、哺乳動物等の生命体に導入されると免疫応答を誘発し得るようなＡＤＧＵＣのポリペプチドまたはオリゴペプチド断片である。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ＡＤＧＵＣのポリペプチド断片またはオリゴペプチド断片を含む。

【００６７】

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。

【００６８】

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。

【００６９】

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

【００７０】

「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。

【００７１】

「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。

【００７２】

「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、この組成物に溶解性を与える。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。

【００７３】

ＡＤＧＵＣの「翻訳後修飾」は、脂質化、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、ラセミ化、タンパク分解性開裂及びその他の当分野で既知の修飾を含み得る。 これらのプロセスは、合成的または生化学的に発生し得る。生化学的修飾は、ＡＤＧＵＣの酵素環境に依存し、細胞タイプによって変化し得る。

【００７４】

「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、ＡＤＧＵＣ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。

【００７５】

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。

【００７６】

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 Ｐｕｂｌ．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。

【００７７】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばＯＬＩＧＯ ４．０６ソフトウェアは、各１００ヌクレオチドまでのＰＣＲプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大５，０００までの大きめのポリヌクレオチドであって３２キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、ＰｒｉｍＯＵプライマー選択プログラム（テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能）は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Ｐｒｉｍｅｒ３プライマー選択プログラム（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（ｍｉｓｐｒｉｍｉｎｇ ｌｉｂｒａｒｙ）」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またはシークエ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。

【００７８】
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。
【００７９】
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。
【００８０】
「調節因子」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。調節因子は、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。
【００８１】
「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な部分である。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。
【００８２】
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。
【００８３】
用語「サンプル」は、その最も広い意味で用いられている。ＡＤＧＵＣ、ＡＤＧＵＣ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。
【００８４】
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。
【００８５】
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、最も好ましいくは９０％以上除去されたものを指す。
【００８６】
「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。
【００８７】

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。

【００８８】

「転写イメージ」または「発現プロファイル」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。

【００８９】

「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。

【００９０】

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（ｔｒａｎｓｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）によって宿主に導入することができる。本発明のＤＮＡをこのような生物体に移入する技術はよく知られており、前出のＳａｍｂｒｏｏｋ 他（１９８９） 等の参考文献に与えられている。

【００９１】

特定の核酸配列の「変異体」は、核酸配列１本全部の長さに対して特定の核酸配列と少なくとも４０％の相同性を有する核酸配列であると定義する。 その際、デフォルトパラメータに設定した「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．９（１９９９年５月７日）を用いてｂｌａｓｔｎを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体（前述）、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多型性」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、ｍＲＮＡプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによって通常、より多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種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」（ＳＮＰ）も含み得る。ＳＮＰの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

【００９２】

特定のポリペプチド配列の「変異体」は、ポリペプチド配列の１本の長さ全体で特定のポリペプチド配列に対して少なくとも４０％の相同性を有するポリペプチド配列として画定される。 ここで、デフォルトパラメータに設定した「ＢＬＡＳＴ ２ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」ツールＶｅｒｓｉｏｎ ２．０．９（１９９９年5月7日）を用いてｂｌａｓｔｐを実行する。このようなポリペプチド対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上の配列同一性を示し得る。

【００９３】

（発明）

本発明は、新規のヒトアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼ（ＡＤＧＵＣ）及びＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの発見に基づき、これらの組成物を利用した神経系疾患、心血管系疾患、視覚系疾患、生殖系疾患、平滑筋疾患、及び細菌感染の診断、治療、及び予防に関する。

【００９４】

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

【００９５】

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

【００９６】

表３は、本発明のポリペプチドの様々な構造的特徴を示す。列１および列２はそれぞれ、本発明の各ポリペプチドのポリペプチド配列識別番号（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ ：）およびそれに対応するＩｎｃｙｔｅ ポリペプチド配列番号（Ｉｎｃｙｔｅ ポリペプチド ＩＤ）を示す。列３は、各ポリペプチドのアミノ酸残基数を示す。列４および列５はそれぞれ、ＧＣＧ配列分析ソフトウェアパッケージのＭＯＴＩＦＳプログラム（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列６は、シグネチャ配列、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。

【００９７】

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、それらの特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドがアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼであることを確立している。例えば、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１はアデニル酸シクラーゼと類似した線虫のタンパク質（ＧｅｎＢａｎｋ ＩＤ ｇ８６８２０１）と４３％の同一性を有することがＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ （ＢＬＡＳＴ）によって示された。（表２参照）。ＢＬＡＳＴ確率スコアは１．７ｅ－４７で

あり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１はまた、ロイシンリッチリピートドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのＰＦＡＭデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。（表３参照）。ＤＯＭＯデータベースを使ったＢＬＡＳＴ解析よりのデータは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１がアデニル酸シクラーゼであることをさらに確証する証拠を提供する。別の例において、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２は推定上のヒトのアデニル酸シクラーゼ（ＧｅｎＢａｎｋ ＩＤ ｇ１５０４０４２）に５１％の同一性を有することがＢａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ（ＢＬＡＳＴ）によって同定された。（表２参照）。ＢＬＡＳＴ確率スコアは２．５ｅ－１２６であり、これは観測されたポリペプチド配列アラインメントが偶然に得られる確率を示している。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２はまた、アデニリルシクラーゼおよびグアニリルシクラーゼに特徴的なロイシンリッチリピートドメインを有するが、これは、隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）を基にした保存されたタンパク質ファミリードメインのＰＦＡＭデータベースにおいて、統計的に有意な一致を検索して決定された。（表３参照）。ＢＬＩＭＰＳ解析よりのデータは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２ が特徴的なロイシンリッチリピートを含むという、さらに実証的な証拠を提供する。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：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。

【００９８】

表４に示すように、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列は、ｃＤＮＡ配列またはゲノムＤＮＡ由来のコード（エキソン）配列を用いて、或いはこれら２種類の配列を任意に組み合わせて構築した。列１は本発明の各ポリヌクレオチドに対するポリヌクレオチド配列識別番号（ポリヌクレオチドＳＥＱ ＩＤ ＮＯ）および対応するＩｎｃｙｔｅポリヌクレオチドコンセンサス配列番号（Ｉｎｃｙｔｅ ＩＤ）、および塩基対の各ポリヌクレオチド配列の長さを示している。列２は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を組み立てるために使用されるｃＤＮＡ配列および／または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’）位置を示すとともに、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４を同定するため、或いはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：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。

【００９９】

表４の列２で記述されたポリヌクレオチド断片は、具体的にはたとえば組織特異的なｃＤＮＡライブラリまたはプールされたｃＤＮＡライブラリに由来するＩｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡを指す場合がある。或いは列２の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列のアセンブリに寄与するＧｅｎＢａｎｋ ｃＤＮＡまたはＥＳＴを指す場合もある。さらに、列２のポリヌクレオチド断片は、ＥＮＳＥＭＢＬ（Ｔｈｅ Ｓａｎｇｅｒ Ｃｅｎｔｒｅ、英国ケンブリッジ）データベースから由来した配列（即ち「ＥＮＳＴ」命名を含む配列）を同定し得る。或いは、列２で記述されたポリヌクレオチド断片は、ＮＣＢＩ ＲｅｆＳｅｑ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｒｅｃｏｒｄｓ データベースから由来する場合もあり（即ち「ＮＭ」または「ＮＴ」の命名を含む配列）、またＮＣＢＩ ＲｅｆＳｅｑ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｒｅｃｏｒｄｓから由来する場合もある（即ち「ＮＰ」の命名を含む配列）。または列で記述されたポリヌクレオチド断片は、「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＿$Ｎ_1$＿$Ｎ_2$＿ＹＹＹＹＹ＿$Ｎ_3$＿$Ｎ_4$ として同定されるポリヌクレオチド配列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がＸＸＸＸＸＸであり、アルゴリズムにより生成される予測の番号がＹＹＹＹＹ であり、（もし存在すれば）$Ｎ_{1,2,3..}$が解析中に手動で編集された可能性のある特定のエキソンであるような「縫合された」配列である（ 実施例５参照 ）。または、列２のポリヌクレオチド断片は「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 として同定されるポリヌクレオチド配列は「ストレッチ」配列である。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では、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。

【０１００】

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）。

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
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)
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。

【０１０１】

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表４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。

【０１０２】

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。

【０１０３】

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

【０１０４】

本発明には、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドも含まれる。特定の実施例において、本発明は、ＡＤＧＵＣをコードするＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価ＲＮＡ配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくてリボースから構成されている。

【０１０５】

本発明はまた、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも約７０％のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも約８５％のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも約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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１０６】

さらに、あるいは別方法において、本発明のポリヌクレオチド変異体はＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列のスプライス変異体である。スプライス変異体はＴＲＩＣＨをコードするポリヌクレオチド配列とかなりの相同性を有し得るが、ｍＲＮＡプロセッシング中のエキソンの選択的スプライシングによる配列ブロックの追加または削除により、通常、がより多くまたはより少数のヌクレオチドを有することになる。スプライス変異体はその全長についてＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列とのポリヌクレオチド配列相同性が約７０％以下、あるいは約６０％、あるいは約５０％以下でありえるが、そのスプライス変異体のある部分はＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列のある部分とのポリヌクレオチド配列相同性が少なくとも約７０％、あるいは少なくとも約８５％、あるいは少なくとも約９５％、あるいは１００％になっている。上記したスプライス変異配列は何れも、ＡＤＧＵＣの機能的或いは構造的特徴の少なくとも１つを有するアミノ酸配列をコードする。

【０１０７】

当業者であれば、遺伝暗号の縮重の結果、ＡＤＧＵＣをコードする多数のポリヌクレオチド配列（既知の遺伝子または天然の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最低限の類似性しか有しないポリヌクレオチド配列もある）を産出し得ることは理解できよう。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。これらの組合せは、天然のＡＤＧＵＣのポリヌクレオチド配列に適用されるような標準トリプレット遺伝暗号を基に作られるものであり、このような変異は全て明確に開示されているものと考えられる。

【０１０８】

ＡＤＧＵＣ及びその変異体をコードするヌクレオチド配列は通常、好適に選択されたストリンジェントな条件下で天然のＡＤＧＵＣのヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能であるが、ＡＤＧＵＣまたはその誘導体であって実質上異なるコドンの使用法があるもの、例えば天然に存在しないコドンの封入があるものをコードするヌクレオチド配列を作り出すことは有益であろう。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ることなくＡＤＧＵＣ及びその誘導体をコードするヌクレオチド配列を実質上変更する別の理由には、天然の配列から作製される転写物より好ましい、例えば半減期が長いなどの特性を有するＲＮＡ転写物の作製がある。

【０１０９】

本発明には、ＡＤＧＵＣ、ＡＤＧＵＣ誘導体及びこれらの断片をコードするＤＮＡ配列又はそれらの断片を完全に合成化学によって作製することも含まれる。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ＡＤＧＵＣ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。

【０１１０】

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等を参照）。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。

【０１１１】

ＤＮＡシークエ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シークエンシング方法を用いて実施可能である。ＤＮＡシークエンシング方法には酵素を用いることができ、例えばＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片、ＳＥＱＵＥＮＡＳＥ（ＵＳ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ，Ｃｌｅｖｅｌａｎｄ ＯＨ）、Ｔａｑポリメラーゼ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、熱安定性Ｔ７ポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ，Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ ＮＪ）を用いることができる。或いは、例えばＥＬＯＮＧＡＳＥ増幅システム（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ ＭＤ）において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、ＭＩＣＲＯＬＡＢ２２００液体転移システム（Ｈａｍｉｌｔｏｎ，Ｒｅｎｏ，ＮＶ）、ＰＴＣ２００サーマルサイクラー（ＭＪ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗａｔｅｒｔｏｗｎ ＭＡ）及びＡＢＩ ＣＡＴＡＬＹＳＴ ８００サーマルサイクラー（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）等の装置を用いて配列の準備を自動化する。次に、ＡＢＩ ３７３ 或いは ３７７ ＤＮＡシークエンシングシステム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）、ＭＥＧＡＢＡＣＥ １０００ ＤＮＡシークエンシングシステム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ ＣＡ）または当分野でよく知られている他の方法を用いてシークエンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する（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）。

【０１１２】

ＡＤＧＵＣをコードする核酸配列を、部分的ヌクレオチド配列を利用し且つ当分野でよく知られているＰＣＲ法をベースにした種々の方法を用いて伸長させ、プロモーター及び調節要素等の上流配列を検出することができる。例えば、使用し得る方法の１つである制限

部位ＰＣＲ法は、ユニバーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムＤＮＡから未知の配列を増幅する方法である（例えば、Ｓａｒｋａｒ，Ｇ．（１９９３）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌｉｃ．２：３１８３２２を参照。）別の方法に逆ＰＣＲ法があり、これは広範な方向に伸長させたプライマーを用いて環状化した鋳型から未知の配列を増幅する方法である。鋳型は、既知のゲノム遺伝子座及びその周辺の配列を含む制限酵素断片から得る（例えば、Ｔｒｉｇｌｉａ，Ｔ．他（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：８１８６。）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ＰｒｏｍｏｔｅｒＦｉｎｄｅｒ（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。

【０１１３】

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。

【０１１４】

市販のキャピラリー電気泳動システムを用いて、シークエンシングまたは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、キャピラリーシークエンシングは、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小断片のシークエンシングに特に適している。

【０１１５】

本発明の別の実施例では、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ、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ＡＤＧＵＣの発現に利用可能である。

【０１１６】

種々の目的でＡＤＧＵＣがコードする配列を変えるために、本発明のヌクレオチド配列を当分野で通常知られている方法を用いて組み換えることができる。 ここで目的には、限定するものではないが遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、発現の調節がある。

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。

【０１１７】

本発明のヌクレオチドを、ＭＯＬＥＣＵＬＡＲＢＲＥＥＤＩＮＧ（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；Ｃｒａｍｅｒｉ，Ａ．他（１９９６）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１４：３１５－３１９）などのＤＮＡシャフリング技術を用いてシャフリングして、ＡＤＧＵＣ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ＴＲＩＣＨ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。

【０１１８】

別の実施例によれば、ＡＤＧＵＣをコードする配列は、当分野で周知の化学的方法を用いて、全体或いは一部が合成可能である（例えば、Ｃａｒｕｔｈｅｒｓ．Ｍ．Ｈ．ら（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ ７：２１５－２２３、Ｈｏｒｎ，Ｔ．他（１９８０）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．Ｓｙｍｐ．Ｓｅｒ７．２２５－２３２等を参照）。或いは、化学的方法を用いてＡＤＧＵＣそれ自体またはその断片を合成し得る。例えば、種々の液相または固相技術を用いてペプチド合成を行うことができる（たとえば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｔ．（１９８４）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，５５－６０ページ；Ｒｏｂｅｒｇｅ，Ｊ．Ｙ．他（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６９：２０２２０４を参照。）自動合成はＡＢＩ４３１Ａペプチドシンセサイザ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて達成し得る。更にＡＤＧＵＣ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。

【０１１９】

このペプチドは、分離用高速液体クロマトグラフィーを用いて実質的に精製し得る（Ｃｈｉｅｚ，Ｒ．Ｍ．およびＦ．Ｚ．Ｒｅｇｎｉｅｒ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８２：３９２－４２１などを参照）。合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析またはシークエ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）。

【０１２０】

生物学的に活性なＡＤＧＵＣを発現させるために、ＡＤＧＵＣをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入することができる。 好適な発現ベクターとは即ち好適な宿主内で挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な

要素を含むベクターである。これらの因子には、ベクター及びＡＤＧＵＣ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。固有開始シグナルを用いて、ＡＤＧＵＣをコードする配列をより効果的に翻訳することが可能もある。このようなシグナルには、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。ＡＤＧＵＣをコードする配列及びその開始コドン、上流の調節配列が好適な発現ベクターに挿入された場合は、更なる転写調節シグナルや翻訳調節シグナルは必要なくなるであろう。しかしながら、コーディング配列或いはその断片のみが挿入された場合は、インフレームのＡＴＧ開始コドンを含む外来性の翻訳調節シグナルが発現ベクターに含まれるようにすべきである。外来性の翻訳要素及び開始コドンは、様々な天然物及び合成物を起源とし得る。用いられる特定の宿主細胞系に好適なエンハンサーを含めることで発現の効率を高めることが可能である。（Ｓｃｈａｒｆ，Ｄ．他（１９９４）Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５－１６２．等を参照）。

【０１２１】

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

【０１２２】

種々の発現ベクター／宿主系を利用して、ＡＤＧＵＣ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などの微生物等や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター（例えばバキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウイルス、ＣａＭＶまたはタバコモザイクウイルスＴＭＶ）または細菌発現ベクター（例えばＴｉまたはｐＢＲ３２２プラスミド）で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系がある。（前出のＳａｍｂｒｏｏｋ、前出のＡｕｓｕｂｅｌ、Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ，Ｇ．およびＳ．Ｍ．Ｓｃｈｕｓｔｅｒ（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：５５０３－５５０９、；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄ、Ｅ．Ｋ．他（１９９４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１：３２２４－３２２７、Ｓａｎｄｉｇ，Ｖ．他（１９９６）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：１９３７－１９４５、Ｔａｋａｍａｔｓｕ，Ｎ．（１９８７）ＥＭＢＯＪ．６：３０７－３１１、；『マグローヒル科学技術年鑑』（Ｔｈｅ ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｙｅａｒｂｏｏｋ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（１９９２）ＭｃＧｒａｗ Ｈｉｌｌ Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ，１９１－１９６ページ、Ｌｏｇａｎ，Ｊ．およびＴ．Ｓｈｅｎｋ（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：３６５５－３６５９、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，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、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる（Ｄｉ Ｎｉｃｏｌａ，Ｍ．他（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎ．Ｔｈｅｒ．５（６）：３５０－３５６、Ｙｕ，Ｍ．他（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０（１３）：６３４０－６３４４、Ｂｕｌｌｅｒ，Ｒ．Ｍ．他（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１７（６０４０）：８１３－８１５

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

【０１２３】

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、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング及び増殖は、ＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ ＣＡ）またはＰＳＰＯＲＴ１プラスミド（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）などの多機能大腸菌ベクターを用いて達成できる。ベクターの多数のクローニング部位にＡＤＧＵＣをコードする配列をライゲーションするとｌａｃＺ遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列におけるｉｎ ｖｉｔｒｏ転写、ジデオキシのシークエンシング、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（例えば、Ｖａｎ Ｈｅｅｋｅ，Ｇ．およびＳ．Ｍ．Ｓｃｈｕｓｔｅｒ（１９８９）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４：５５０３５５０９を参照）。例えば、抗体の産生のためなどに多量のＡＤＧＵＣが必要な場合は、ＡＤＧＵＣの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導ＳＰ６バクテリオファージプロモーターまたは誘導Ｔ７バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

【０１２４】

ＡＤＧＵＣの発現に酵母の発現系の使用が可能である。α因子、アルコールオキシダーゼ、ＰＧＨプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、出芽酵母菌（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）またはピキア酵母（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ）に使用可能である。更に、このようなベクターは、発現したタンパク質の分泌か細胞内への保持のどちらかを誘導し、安定した増殖のために宿主ゲノムの中に外来配列を組み込む。（例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ，１９９５，前出、Ｂｉｔｔｅｒ，Ｇ．Ａ．他（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４、及びＳｃｏｒｅｒ．Ｃ．Ａ．他（１９９４）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １２１：１８１－１８４．を参照）。

【０１２５】

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

【０１２６】

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ＡＤＧＵＣをコードする配列を結合し得る。非必須のＥ１またはＥ３領域へウイルスのゲノムを挿入し、宿主細胞でＡＤＧＵＣを発現する感染ウイルスを得ることが可能である。（例えば、Ｌｏｇａｎ，Ｊ．およびＴ．Ｓｈｅ

ｎｋ（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８１：３６５３６５９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。

【０１２７】

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ＨＡＣを作製し、従来の輸送方法（リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー、またはベシクル）で供給する。（例えば、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ．Ｊ．Ｊ．他（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５－３５５．を参照）。

【０１２８】

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、細胞株におけるＡＤＧＵＣの安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターであって複製発現因子、内因性発現因子、或いはその両者のウイルス起源を含むものと、同一ベクター上或いは別のベクター上の選択可能マーカー遺伝子とを用いて、ＡＤＧＵＣをコードする配列を細胞株に形質転換することが可能である。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約１～２日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

【０１２９】

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－細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、ａｐｒ－細胞のために用いられる単純ヘルペスウイルスの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）Ｃｅｌｌ１１：２２３－２３２；及びＬｏｗｙ，Ｉ．他（１９８０）Ｃｅｌｌ２２：８１７－８２３を参照）。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えばｄｈｆｒはメトトレキセートに対する耐性を与え、ｎｅｏはアミノグリコシッドネオマイシン及びＧ－４１８に対する耐性を与え、ａｌｓはクロルスルフロンに対する耐性を、ｐａｔはホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える（Ｗｉｇｌｅｒ，Ｍ．他（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：３５６７３５７０；ＣｏｌｂｅｒｅＧａｒａｐｉｎ，Ｆ．他（１９８１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５０：１１４　等を参照）。こ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．およびＲ．Ｃ．Ｍｕｌｌｉｇａｎ（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８５：８０４７８０５１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）、βグルクロニダーゼ及びその基質βグルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、トランスフォーマントを特定するだけでなく、特定のベクター系に起因する一過性或いは安定したタンパク質発現を定量することが可能である（Ｒｈｏｄｅｓ，Ｃ．Ａ．（１９９５）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．５５：１２１１３１等を参照）。

【０１３０】

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、ＡＤＧＵＣをコードする配列がマーカー遺伝子配列内に挿入された場合、ＡＤＧＵＣをコードする配列を含む形質転換細胞は、マーカー遺伝子機能の欠落により同定することが可能である。または、１つのプロモーターの制御下でマーカー遺伝子がＡＤＧＵＣ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。

【０１３１】

一般に、ＡＤＧＵＣをコードする核酸配列を含み、ＡＤＧＵＣを発現する宿主細胞は、当業者に周知の種々の方法を用いて特定することが可能である。 これらの方法には、ＤＮＡ－ＤＮＡ或いはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリダイゼーションや、ＰＣＲ法、核酸或いはタンパク質の検出及び／または数量化のための膜系、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生物学的試験法または免疫学的アッセイが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０１３２】

特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のどちらかを用いるＡＤＧＵＣの発現の検出及び計測のための免疫学的な方法は、当分野で周知である。 このような技法には、酵素に結合したイムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、蛍光標示式細胞分取器（ＦＡＣＳ）などがある。ＡＤＧＵＣ上の２つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、２部位のモノクローナルベースイムノアッセイ（ｔｗｏ－ｓｉｔｅ，ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ－ｂａｓｅｄ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である（Ｈａｍｐｔｏｎ．Ｒ．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，Ｈｕｍａｎｓ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ ＮＪ等を参照）。

【０１３３】

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。ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１３４】

ＡＤＧＵＣ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。ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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。

【０１３５】

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シングを利用して、タンパク質の標的への誘導、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に選択し得る。

【０１３６】

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

【０１３７】

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<u>ｉｎ ｖｉｔｒｏ</u>で放射能標識したＡＤＧＵＣ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^{35}Ｓメチオニンのような放射能標識したアミノ酸前駆体の存在下で起こる。

【０１３８】

本発明のＡＤＧＵＣまたはその断片を用いて、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１３９】

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

の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

【０１４０】

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

【０１４１】

本発明のＡＤＧＵＣまたはその断片を用いて、ＡＤＧＵＣ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、部分的アゴニスト、または逆アゴニスト等が含まれる。一実施例では、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣと混合し、試験化合物の存在下でＡＤＧＵＣの活性を試験化合物不在下でのＡＤＧＵＣの活性と比較する。試験化合物の存在下でのＡＤＧＵＣの活性の変化は、ＡＤＧＵＣの活性を調整する化合物の存在を示唆する。別法では、試験化合物をＡＤＧＵＣの活性に適した条件下でＡＤＧＵＣを含むｉｎ ｖｉｔｒｏまたは無細胞再構成系と結合させてアッセイを実施する。これらアッセイの何れかにおいて、ＡＤＧＵＣ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。

【０１４２】

別の実施例では、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）における相同組換えを用いて動物モデル系内で、ＡＤＧＵＣ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 ２４４：１２８８－１２９２）等のマーカー遺伝子で破壊した目的の遺伝子を含むベクターで形質転換する。このベクターは、相同組換えにより宿主ゲノムの対応する領域に組み込まれる。別法では、Ｃｒｅ－ｌｏｘＰ系を用いて相同組換えを行い、組織特異的または発生段階特異的に目的遺伝子をノックアウトする（Ｍａｒｔｈ，Ｊ．Ｄ．（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９７：１９９９－２００２；Ｗａｇｎｅｒ，Ｋ．Ｕ．他（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：４３２３－４３３０）。形質転換したＥＳ細胞を同定し、例えばＣ５７ＢＬ／６マウス系等から採取したマウス細胞胚盤胞に微量注入する。胚盤胞を偽妊娠メスに外科的に導入し、得られるキメラ子孫の遺伝形質を決め、これを交配させてヘテロ接合性系またはホモ接合性系を作製する。このようにして作製した遺伝子組換え動物は、可能性のある治療薬や毒性薬剤で検査することができる。

【０１４３】

ＡＤＧＵＣ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）。

【０１４４】

ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの或

る領域を動物ＥＳ細胞に注入し、注入した配列を動物細胞ゲノムに組み込ませる。形質転換細胞を胞胚に注入し、胞胚を上記のように移植する。遺伝子組換え子孫または近交系について研究し、可能性のある医薬品を用いて処理し、ヒトの疾患の治療に関する情報を得る。別法では、例えばＡＤＧＵＣを乳汁内に分泌するなどＡＤＧＵＣ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）。

（治療）

ＡＤＧＵＣのある領域とアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼのある領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的及び構造的類似性が存在する。さらに、ＡＤＧＵＣを発現する組織の例としては子宮膜内平滑筋腫および脳組織があり、表６にも示されている。よってＡＤＧＵＣ は神経系疾患、心血管系疾患、視覚系疾患、生殖系疾患、平滑筋疾患及び細菌感染においてある役割を果たすと考えられる。ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣの発現または活性を低下させることが望ましい。また、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣの発現または活性を亢進させることが望ましい。

【０１４５】

従って、一実施例において、ＡＤＧＵＣの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、患者にＡＤＧＵＣまたはその断片や誘導体を投与することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として、神経障害として、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、パーキソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側策硬化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、多発性硬化症その他の脱髄疾患、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と、クールー、クロイツフェルト‐ヤコブ病及びガストマン‐ストラウスラー‐シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症（ｃｅｒｅｂｅｌｌｏｒｅｔｉｎａｌ ｈｅｍａｎｇｉｏｂｌａｓｔｏｍａｔｏｓｉｓ）、脳３叉神経血管症候群、精神薄弱を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、動静脈瘻などの心疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧、血管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈乖離、拡張蛇行静脈、血栓、静脈血栓症、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術（ｂａｌｌｏｏｎ ａｎｇｉｏｐｌａｓｔｙ）、血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術（ｃｏｒｏｎａｒｙ ａｒｔｅｒｙ ｂｙｐａｓｓ ｇｒａｆｔ ｓｕｒｇｅｒｙ）、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性２尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化（ｍｉｔｒａｌ ａｎｎｕｌａｒ ｃａｌｃｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症などの心疾患、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束型肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及びマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏症肺炎、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎－器質性肺炎（ｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉａ ｂｒｏｎｃｈｉｏｌｉｔｉｓ ｏｂｌｉｔｅｒａｎｓ－ｏｒｇａｎｉｚｉｎｇ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、肺移植の合併症があり、視覚系疾患の中には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強

膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、中毒性視覚神経炎、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、交叉腫瘍（ｃｈｉａｓｍａｌ ｔｕｍｏｒ）、生殖系疾患としてプロラクチン産生障害があり、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、女性化乳房が含まれる。平滑筋疾患には、限定されるものではないが平滑筋の正常な活動の欠陥或いは変性すべてが含まれ、狭心症、アナフィラキシー性ショック、不整脈、喘息、心臓血管性ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、偏頭痛、およびクロム親和細胞腫（褐色細胞腫）、および心筋症、脳疾患、癲癇、カーンズ・セイヤー症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性疾患、および眼筋麻痺などのミオパシーが含まれる。そして細菌による感染は肺炎球菌感染症、ブドウ球菌、連鎖球菌、バシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キンゲラ、ヘモフィルス、レジオネラ、百日咳菌、シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含むグラム陰性菌腸内細菌、シュードモナス、ビブリオ、ブルセラ、野兎病菌、エルシニア、バルトネラ、ｎｏｒｃａｒｄｉｕｍ、放線菌、ミコバクテリウム、ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａｌｅ、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類される。

【０１４６】

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ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣまたはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。

【０１４７】

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ＡＤＧＵＣの発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、実質的に精製されたＡＤＧＵＣを含む組成物を好適な医薬用キャリアと共に患者に投与することも可能である。

【０１４８】

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ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１４９】

更なる実施例では、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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、上記の神経系疾患、心血管系疾患、視覚系疾患、生殖系疾患、平滑筋疾患、及び細菌感染が含まれる。一実施態様では、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣを発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲッティング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【０１５０】

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ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１５１】

別の実施例では、本発明の任意のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補配列、またはベクターを、別の好適な治療薬と組み合わせて投与することもできる。併用療法で用いる好適な治療薬は、当業者が従来の医薬原理に従って選択し得る。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。

【０１５２】

ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣと特異的に結合するものを同定することが可能である。ＡＤＧＵＣ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。

【０１５３】

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、ＡＤＧＵＣ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‐ゲラン杆菌）及びコリネバクテリウム‐パルバム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｐａｒｖｕｍ）が特に好ましい。

【０１５４】

ＡＤＧＵＣ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ることが望ましい。ＡＤＧＵＣのアミノ酸の短い区間を、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を産生し得る。

【０１５５】

ＡＤＧＵＣ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）。

【０１５６】

更に、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「キメラ抗体」作製のために開発した技術が、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、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓ．Ｌ．他．（１９８４）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：６８５１６８５５；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、ＡＤＧＵＣ特異性一本鎖抗体を生成する。関連特異性を有するがイディオタイプ組成が異なるような抗体を、ランダムな組合せの免疫グロブリンライブラリからチェーンシャッフリングによって産生することもできる（Ｂｕｒｔｏｎ Ｄ．Ｒ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：１０１３４－１０１３７等を参照）。

【０１５７】

抗体の産生は、リンパ球集団におけるｉｎ ｖｉｖｏ産生の誘導によって、或いは免疫グロブリンライブラリのスクリーニングまたは文献に開示されているような高特異結合試薬のパネルのスクリーニングによっても行い得る（Ｏｒｌａｎｄｉ，Ｒ．他（１９８９

）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：３８３３－３８３７、Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．他（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ３４９：２９３－２９９等を参照）。

【０１５８】

ＡＤＧＵＣに対する特異的な結合部位を含む抗体も産生される。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）Ｓｃｉｅｎｃｅ２４６：１２７５－１２８１等を参照）。

【０１５９】

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結合アッセイ、または免疫放射定量測定法のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このようなイムノアッセイには、ＡＤＧＵＣとその特異性抗体との間の複合体形成の計測が含まれる。２つの非干渉性ＡＤＧＵＣエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いるような、２部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合結合アッセイを利用してもよい（前出のＰｏｕｎｄの文献）。

【０１６０】

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、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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10^9～10^{12}ｌｉｔｅｒ／ｍｏｌの高親和性抗体試薬は、ＡＤＧＵＣ抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。Ｋａ値が10^6～10^7ｌｉｔｅｒ／ｍｏｌの低親和性抗体試薬は、ＡＤＧＵＣ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 Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ ＮＹ）。

【０１６１】

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１～２ｍｇ／ｍｌの特異的な抗体、好ましくは５～１０ｍｇ／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、ＡＤＧＵＣ抗体複合体を沈殿させなければならない処理に用いられる。抗体の特異性、抗体価、結合活性、様々な適用例における抗体の品質や使用に対する指針については、一般に入手可能である。（前出のＣａｔｔｙの文献、同Ｃｏｌｉｇａｎ 他の文献等を参照）。

【０１６２】

本発明の別の実施例では、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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、ＲＮＡ、ＰＮＡあるいは修飾ヌクレオチド）を設計して遺伝子発現を変更することができる。このような技術は当分野では周知であり、アンチセンスオリゴヌクレオチドま

たはより大きな断片が、ＡＤＧＵＣ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を参照。）

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作製する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である（Ｓｌａｔｅｒ，Ｊ．Ｅ．他（１９９８）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０２（３）：４６９－４７５及びＳｃａｎｌｏｎ，Ｋ．Ｊ．ら（１９９５）９（１３）：１２８８－１２９６．等を参照）。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる（Ｍｉｌｌｅｒ，Ａ．Ｄ．（１９９０）Ｂｌｏｏｄ ７６：２７１、前出のＡｕｓｕｂｅｌ、Ｕｃｋｅｒｔ，Ｗ．およびＷ．Ｗａｌｔｈｅｒ（１９９４）Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｈｅｒ．６３（３）：３２３－３４７等を参照）。その他の遺伝送達機構には、リポソーム系、人工的なウイルスエンベロープ及び当分野で公知のその他の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）。

【０１６３】

本発明の別の実施例では、ＡＤＧＵＣ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（ＳＣＩＤ）－Ｘ１の場合）、先天性アデノシンデアミナーゼ（ＡＤＡ）欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損（Ｂｌａｅｓｅ，Ｒ．Ｍ．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（ｔｈａｌａｓｓａｍｉａ）、家族性高コレステロール血症、第ＶＩＩＩ因子若しくは第ＩＸ因子欠損に起因する血友病（Ｃｒｙｓｔａｌ，３５ Ｒ．Ｇ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４０４－４１０、Ｖｅｒｍａ，Ｉ．Ｍ．およびＮ．Ｓｏｍｉａ（１９９７）Ｎａｔｕｒｅ ３８９：２３９－２４２）を治療し、（ｉｉ）条件的致死性遺伝子産物を発現させ（例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合）、（ｉｉｉ）細胞内の寄生虫（例えばヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）（Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｄ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３５：３９５－３９６、Ｐｏｅｓｃｂｌａ，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等の真菌寄生虫、並びにＰｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｕｍ及びＴｒｙｐａｎｏｓｏｍａ ｃｒｕｚｉ等の原虫寄生体に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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。

【０１６４】

本発明の更なる実施例では、ＡＤＧＵＣをコードする哺乳動物発現ベクターを作製し、これらのベクターを機械的手段によってＡＤＧＵＣ欠損細胞に導入することによって、ＡＤ

ＧＵＣの欠損による疾患や異常症を治療する。ｉｎ ｖｉｖｏ或いはｅｘ ｖｉｔｒｏの細胞に用いる機械的導入技術には、（ｉ）個々の細胞内への直接的なＤＮＡ微量注射法、（ｉｉ）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）。

【０１６５】

限定するものではないがＴＲＩＣＨの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、ＰＣＤＮＡ３．１、ＥＰＩＴＡＧ、ＰＲＣＣＭＶ２、ＰＲＥＰ、ＰＶＡＸ、ＰＣＲ２－ＴＯＰＯＴＡベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）、ＰＣＭＶ－ＳＣＲＩＰＴ、ＰＣＭＶ－ＴＡＧ、ＰＥＧＳＨ／ＰＥＲＶ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ，Ｌａ Ｊｏｌｌａ ＣＡ）及びＰＴＥＴ－ＯＦＦ、ＰＴＥＴ－ＯＮ、ＰＴＲＥ２、ＰＴＲＥ２－ＬＵＣ、ＰＴＫ－ＨＹＧ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）がある。ＡＤＧＵＣを発現させるために、（ｉ）恒常的に活性なプロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、ＳＶ４０ウイルス、チミジンキナーゼ（ＴＫ）、若しくはβ－アクチン遺伝子等）、（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．および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．および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．およびＨ．Ｍ．Ｂｌａｕ，前出）、または（ｉｉｉ）正常な個体に由来するＡＤＧＵＣをコードする内因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。

【０１６６】

市販のリポソーム形質転換キット（例えばＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社のＰＥＲＦＥＣＴ ＬＩＰＩＤ ＴＲＡＮＳＦＥＣＴＩＯＮ ＫＩＴ）を用いれば、当業者は経験にそれほど頼らないでもポリヌクレオチドを培養中の標的細胞に導入することが可能になる。別法では、リン酸カルシウム法（Ｇｒａｈａｍ．Ｆ．Ｌ．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。

【０１６７】

本発明の別の実施例では、ＡＤＧＵＣの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、（ｉ）レトロウイルス末端反復配列（ＬＴＲ）プロモーターまたは独立プロモーターの制御下でＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドと、（ｉｉ）好適なＲＮＡパッケージングシグナルと、（ｉｉｉ）追加レトロウイルス・シス作用性ＲＮＡ配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコード配列を伴うＲｅｖ応答性因子（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）。

【０１６８】

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、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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膵臓の無損傷の膵島内に導入するために融通のきくことが証明された（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。

【０１６９】

別法では、ヘルペス系遺伝子治療の送達系を用いて、ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣを導入する際に特に有用である。ヘルペス系ベクターの作製及びパッケージングは、当業者に公知である。複製適格性単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）Ｉ型系のベクターは、レポーター遺伝子を霊長類の眼に送達するために用いられてきた（Ｌｉｕ，Ｘ．他（１９９９）Ｅｘｐ．Ｅｙｅ Ｒｅｓ．１６９：３８５－３９５）。ＨＳＶ－１ウイルスベクターの作製についても、ＤｅＬｕｃａに付与された米国特許第５，８０４，４１３号（「Ｈｅｒｐｅｓ ｓｉｍｐｌｅｘ ｖｉｒｕｓ ｓｗａｉｎｓ ｆｏｒ ｇｅｎｅ ｔｒａｎｓｆｅｒ」）に開示されており、該特許の引用をもって本明細書の一部とする。米国特許第５，８０４，４１３号には、ヒト遺伝子治療を含む目的のために好適なプロモーターの制御下において細胞に導入される少なくとも１つの外在性遺伝子を有するゲノムを含む組換えＨＳＶ ｄ９２についての記載がある。上記特許はまた、ＩＣＰ４、ＩＣＰ２７及びＩＣＰ２２のために除去される組換えＨＳＶ系統の作製及び使用について開示している。ＨＳＶベクターについては、Ｇｏｉｎｓ，Ｗ．Ｆ．他（１９９９）Ｊ．Ｖｉｒ

ｏｌ．７３：５１９－５３２及びＸｕ，Ｈ．他（１９９４）Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．１６３：１５２－１６１も参照されたい。両文献は、引用をもって本明細書の一部とする。クローン化ヘルペスウイルス配列の操作、巨大ヘルペスウイルスのゲノムの異なった部分を含む多数のプラスミドを形質移入した後の組換えウイルスの産生、ヘルペスウイルスの成長及び増殖、並びにヘルペスウイルスの細胞への感染は、当業者に公知の技術である。

【０１７０】

別法では、αウイルス（正の一本鎖ＲＮＡウイルス）ベクターを用いてＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのαウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス（Ｓｅｍｌｉｋｉ Ｆｏｒｅｓｔ Ｖｉｒｕｓ，ＳＦＶ）の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがＳＦＶゲノムに基づいていることが分かった（Ｇａｒｏｆｆ，Ｈ．及びＫ．－Ｊ．Ｌｉ（１９９８）Ｃｕｎ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．９：４６４－４６９）。αウイルスＲＮＡの複製中に、通常はウイルスのキャプシッドタンパク質をコードするサブゲノムＲＮＡが作り出される。このサブゲノムＲＮＡは、完全長のゲノムＲＮＡより高いレベルに複製されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に比べてキャプシッドタンパク質が過剰産生される。同様に、ＡＤＧＵＣに対するコード配列をカプシドコード領域のαウイルスゲノムに導入することにより、ベクター導入細胞において多数のＡＤＧＵＣコードＲＮＡが産生され、高レベルのＡＤＧＵＣが合成される。通常はαウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス（ＳＩＮ）の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞（ＢＨＫ－２１）の持続的な感染を確立する能力は、αウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している（Ｄｒｙｇａ，Ｓ．Ａ．他（１９９７）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ２２８：７４－８３）。様々な宿主にαウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にＡＤＧＵＣを導入することできる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。αウイルスの感染性ｃＤＮＡクローンの処置方法、αウイルスのｃＤＮＡ及びＲＮＡの形質移入方法及びαウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【０１７１】

転写開始部位由来のオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を阻害することも可能である。転写開始部位とは例えば開始部位から数えて約－１０と約＋１０の間である。同様に、三重らせん塩基対の形成方法を用いて阻害が可能となる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分に開くような二重らせんの能力を阻害するので、三重らせん塩基対形成は有用である。三重らせんＤＮＡを用いる最近の治療の進歩については文献に記載がある（Ｇｅｅ，Ｊ．Ｅ．他（１９９４）ｉｎ：Ｈｕｂｅｒ，Ｂ．Ｅ．およびＢ．Ｉ．Ｃａｒｒ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ，Ｆｕｔｕｒａ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｍｔ．Ｋｉｓｃｏ，ＮＹ，１６３－１７７ページ等を参照。）相補配列またはアンチセンス分子もまた、転写物がリボソームに結合するのを阻止することによってｍＲＮＡの翻訳を阻止するべく設計することができる。

【０１７２】

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、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とその後に起こる内ヌクレオチド鎖切断に関与している。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、ＡＤＧＵＣをコードする配列の内ヌクレオチド鎖切断を特異的且つ効果的に触媒できる可能性がある。

【０１７３】

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。

【０１７４】

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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１７５】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにＲＮＡ分子を修飾することができる。限定するものではないが可能な修飾には、分子の５’末端、３’末端、あるいはその両方においてフランキング配列を追加したり、分子の主鎖内においてホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオネートまたは２’　Ｏ－メチルを使用したりすることが含まれる。この概念は、ＰＮＡの産出に固有のものであり、これら全ての分子に拡大することができる。それには、内因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）、ワイブトシン（ｗｙｂｕｔｏｓｉｎｅ）等を加えることでできる。

【０１７６】

本発明の追加実施例は、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物をスクリーニングする方法を含む。限定するものではないが特異ポリヌクレオチドの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、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの発現を特異的に阻害する化合物が治療上有用であり、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０１７７】

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。ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、このようにして得られた試験化合物の少なくとも１つに曝露する。サンプルには例えば、無傷細胞、透過化処理した細胞、無細胞再構成系または再構成生化学系があり得る。ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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）。

【０１７８】

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）。

【０１７９】

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。

【０１８０】

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

【０１８１】

本発明に用いられる組成物は、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。

【０１８２】

肺から投与する組成物は、液状または乾燥粉末状で調製し得る。このような組成物は通常、患者が吸入する直前にエアロゾル化する。小分子（例えば従来の低分子量有機薬）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胞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。

【０１８３】

本発明での使用に適した組成物には、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。

【０１８４】
ＡＤＧＵＣ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。或いは、ＡＤＧＵＣまたはその断片をＨＩＶ Ｔａｔ－１タンパク質から陽イオンＮ末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている（Ｓｃｈｗａｒｚｅ，Ｓ．Ｒ．他（１９９９）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５：１５６９－１５７２）。

【０１８５】
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、サル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。

【０１８６】
治療有効量は、症状や容態を回復させるような活性成分（例えば、ＡＤＧＵＣまたはその断片、ＡＤＧＵＣの抗体、ＡＤＧＵＣのアゴニスト、アンタゴニストまたはインヒビターなど）の量を意味する。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ED_{50}（集団の５０％の治療有効量）またはLD_{50}（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、LD_{50}／ED_{50}比として表すことができる。高い治療指数を示すような組成物が望ましい。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、ED_{50}を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【０１８７】
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、患者の通常の健康状態、患者の年齢、体重及び性別、投与の時間及び頻度、薬剤の配合、反応感受性及び治療に対する応答等を考慮する。作用期間が長い組成物は、特定の製剤の半減期及びクリアランス率によって３～４日毎に１度、１週間に１度、或いは２週間に１度の間隔で投与し得る。

【０１８８】
通常の投与量は、投与の経路にもよるが約０．１～１００，０００μｇ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。

（診断）
別の実施例では、ＡＤＧＵＣの発現によって特徴付けられる疾患の診断のために、或いはＡＤＧＵＣやＡＤＧＵＣのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤で治療を受けている患者をモニターするためのアッセイにおいて、ＡＤＧＵＣを特異的に結合する抗体が用いられることがある。診断目的に有用な抗体は、上記の治療の箇所で記載した方法と同じ方法で調合される。ＡＤＧＵＣの診断アッセイには、抗体及び標識を利用してヒトの体液において或いは細胞や組織のエキスにおいてＡＤＧＵＣを検出する方法が含まれる。この抗体は修飾されたものもされていないものも可能であり、レポーター分子との共有結合または非共有結合で標識化できる。レポーター分子としては広くさまざまな種類が本分野で知

られており、また使用可能であるが、そのうちのいくつかは上記で説明されている。

【０１８９】

ＡＤＧＵＣを測定するための様々なプロトコル、例えばＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ＦＡＣＳ等が本技術分野において知られており、ＡＤＧＵＣ発現の修正レベル或いは異常レベルを診断する基準を提供する。正常或いは標準的なＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣに対する抗体とを結合させることによって決定する。標準複合体形成量は、種々の方法、例えば測光法で定量できる。被験者、対照及び疾患の生検組織からのサンプルのＡＤＧＵＣの発現の量が基準値と比較される。標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。

【０１９０】

別の実施例によれば、ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドを診断目的に用いることもできる。用いられることができるポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、相補的ＲＮＡ及びＤＮＡ分子、そしてＰＮＡが含まれる。このポリヌクレオチドを用いて、疾患と相関し得るＡＤＧＵＣ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。診断アッセイは、ＡＤＧＵＣの不在、存在及び過剰発現を測定するために、そして治療インターベンション中にＡＤＧＵＣレベルの調製をモニターするために用いることができる。

【０１９１】

ある実施形態では、ＡＤＧＵＣをコードする核酸配列を同定するために、ＡＤＧＵＣまたは近縁の分子をコードする、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なＰＣＲプローブとのハイブリダイゼーションを用いることができる。プローブが高度に特異的な領域（例えば５’調節領域）から作られている、或いはやや特異性の低い領域（例えば保存されたモチーフ）から作られているかにかかわらず、そ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によって、そのプローブがＡＤＧＵＣをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列コードする自然界の配列のみを同定するかどうかが決まるであろう。

【０１９２】

プローブはまた、関連する配列の検出にも用いることができ、その配列はＡＤＧＵＣをコードする任意の配列と少なくとも５０％の相同性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、ＤＮＡあるいはＲＮＡが可能であり、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３－４の配列、或いはＡＤＧＵＣ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。

【０１９３】

ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ及びＡＤＧＵＣ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、^{32}Ｐまたは^{35}Ｓ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。

【０１９４】

ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、ＡＤＧＵＣの発現に関連する疾患を診断することが可能である。限定するものではないがこのような疾患の例として、神経障害として、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、パーキソン病その他の錐体外路障害、筋萎縮性側策硬化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、多発性硬化症その他の脱髄疾患、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と、クールー、クロイツフェルト‐ヤコブ病及びガストマン‐ストラウスラー‐シャインカー症候群を含むプリオン病と、致死性家族性不眠症、神経系の栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜性血管芽腫症（ｃｅｒｅｂｅｌｌｏｒｅｔｉｎａｌ ｈｅｍａｎｇｉｏｂｌａｓｔｏｍａｔｏｓｉｓ）、脳３叉神経血管症候群、精神薄弱を含むその他の中枢神経系発達障害、脳性麻痺、神経骨格異常、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄病、筋ジストロフィーその他の神経筋疾患、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎と、遺伝性、代謝性、内分泌性及び中毒性ミオパシーと、重症筋無力症、周期性四肢麻痺と、気分障害、不安障害及び精神分裂病を含む精神障害と、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、トゥーレット病、動静脈瘻などの心疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧、血管炎、レイノー病、動脈瘤、動脈乖離、拡張蛇行静脈、血栓、静脈血栓症、血管の腫瘍、血栓崩壊の合併症、バルーン血管形成術（ｂａｌｌｏｏｎ ａｎｇｉｏｐｌａｓｔｙ）、血管置換術、大動脈冠動脈バイパス術移植手術（ｃｏｒｏｎａｒｙ ａｒｔｅｒｙ ｂｙｐａｓｓ ｇｒａｆｔ ｓｕｒｇｅｒｙ）、うっ血性心不全、虚血性心疾患、狭心症、心筋梗塞、高血圧性心疾患、変性弁膜性心疾患、石灰化大動脈弁狭窄症、先天性２尖大動脈弁、僧帽弁輪状石灰化（ｍｉｔｒａｌ ａｎｎｕｌａｒ ｃａｌｃｉｆｉｃａｔｉｏｎ）、僧帽弁脱出、リウマチ熱、リウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎、全身性紅斑性狼瘡の心内膜炎、カルチノイド心疾患、心筋症、心筋炎、心膜炎、腫瘍性心疾患、先天性心臓疾患、心臓移植の合併症などの心疾患、先天性肺異常、肺拡張不全、肺うっ血及び肺水腫、肺動脈塞栓症、肺出血、肺梗塞、肺高血圧症、血管硬化症、閉塞性肺疾患、拘束型肺疾患、慢性閉塞性肺疾患、肺気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、細気管支拡張症、細菌性肺炎、ウイルス性肺炎及びマイコプラズマ肺炎、肺膿瘍、肺結核、びまん性間質性疾患、塵肺症、サルコイド症、特発性肺線維症、剥離性間質性肺炎、過敏症肺炎、肺好酸球増加閉塞性細気管支炎－器質性肺炎（ｐｕｌｍｏｎａｒｙ ｅｏｓｉｎｏｐｈｉｌｉａ ｂｒｏｎｃｈｉｏｌｉｔｉｓ ｏｂｌｉｔｅｒａｎｓ－ｏｒｇａｎｉｚｉｎｇ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ）、肺移植の合併症があり、視覚系疾患の中には、結膜炎、乾性角結膜炎、角膜炎、上強膜炎、虹彩炎、後部ブドウ膜炎、緑内障、一過性黒内障、虚血性視神経症、視神経炎、レーバー遺伝性視神経症、中毒性視覚神経炎、硝子体剥離、網膜剥離、白内障、黄斑変性症、中心性漿液性脈絡網膜症、色素性網膜炎、脈絡膜黒色腫、球後腫瘍、交叉腫瘍（ｃｈｉａｓｍａｌ ｔｕｍｏｒ）、生殖系疾患としてプロラクチン産生障害があり、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、女性化乳房が含まれる。平滑筋疾患には、限定されるものではないが平滑筋の正常な活動の欠陥或いは変性すべてが含まれ、狭心症、アナフィラキシー性ショック、不整脈、喘息、心臓血管性ショック、クッシング症候群、高血圧、低血糖症、心筋梗塞、偏頭痛、およびクロム親和細胞腫（褐色細胞腫）、および心筋症、脳疾患、癲癇、カーンズ・セイヤー症候群、乳酸アシドーシス、筋クローヌス性疾患、および眼筋麻痺などのミオパシーが含まれる。そして細菌による感染は肺炎球菌感染症、ブドウ球菌、連鎖球菌、バシラス菌、コリネバクテリウム、クロストリジウム、髄膜炎菌、淋菌、リステリア、モラクセラ、キンゲラ、ヘモフィルス、レジオネラ、百日咳菌、シゲラ、サルモネラ、カンピロバクターを含むグラム陰性菌腸内細菌、シュードモナス、ビブリオ、ブルセラ、野兎病菌、エルシニア、バルトネラ、ｎｏｒｃａｒｄｉｕｍ、放線菌、ミコバクテリウム、ｓｐｉｒｏｃｈａｅｔａｌｅ、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマに分類される。ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法、ノーザン法、ドットブロット法やその他の膜ベースの技術と、ＰＣＲ法と、ディップスティック（ｄｉｐｓｔｉｃｋ）法、ピン及びマルチフォーマットＥＬＩＳＡ様アッセイと、変異ＡＤＧＵＣの発現を検出するために患者から採取した体液または組織を利用するマイクロアレイとにおいて使用し得る。この

ような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

【０１９５】

或る形態では、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて、ＡＤＧＵＣをコードするヌクレオチド配列が有用であり得る。ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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。

【０１９６】

ＡＤＧＵＣ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、動物或いはヒトの正常な被験者から抽出した体液或いは細胞を、ＡＤＧＵＣをコードする配列またはその断片と結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な被験者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。

【０１９７】

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。

【０１９８】

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。

【０１９９】

ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはＡＤＧＵＣをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下で、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁の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が可能である。

【０２００】

或る実施態様において、ＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。ｆＳＣＣＰ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シークエ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，ｉｓＳＮＰ）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オーバーラップする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クエンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理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。

【０２０１】

ＡＤＧＵＣの発現を定量するために用い得る方法には、ヌクレオチドの放射標識またはビオチン標識、調節核酸の相互増幅（ｃｏａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）及び標準曲線から得た結果の補間もある（例えば、Ｍｅｌｂｙ，Ｐ．Ｃ．他（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １５９：２３５２４４；Ｄｕｐｌａａ，Ｃ．他（１９９３）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２１２：２２９２３６を参照。）目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【０２０２】

更に別の実施例では、本明細書で記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおけるエレメントとして用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多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ィールを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロフィールに基づき、患者に対して高度に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。

【０２０３】

別の実施例では、ＡＤＧＵＣ、ＡＤＧＵＣの断片、ＡＤＧＵＣ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ィールをモニターまたは測定することが可能である。

【０２０４】

或る実施例は、或る組織または細胞タイプの転写イメージを生成するような本発明のポリヌクレオチドの使用に関連する。転写イメージは、特定の組織または細胞タイプにより遺伝子発現の包括的パターンを表す。包括的遺伝子発現パターンは、所定の条件下で所定の時間に発現した遺伝子の数及び相対存在量を定量することにより分析される（Ｓｅｉｌｈａｍｅｒ 他、米国特許第５，８４０，４８４号の「Ｃｏｍｐａｒａｔｉｖｅ Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ Ａｎａｌｙｓｉｓ」を参照。この特許に言及することを以って本明細書の一部とする）。従って、特定の組織または細胞タイプの転写または逆転写全体に本発明のポリヌクレオチドまたはその補体をハイブリダイズすることにより、転写イメージを生成し得る。或る実施例では、本発明のポリヌクレオチドまたはその補体がマイクロアレイ上のエレメントのサブセットを複数含むような高処理フォーマットでハイブリダイゼーションを発生させる。結果として得られる転写イメージは、遺伝子活性のプロフィー

ルを提供し得る。

【０２０５】

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。

【０２０６】

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。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てることが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない（例えば２０００年２月２９日に米国国立環境健康科学研究所（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、毒性シグネチャを用いる中毒学的スクリーニングの際に、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。

【０２０７】

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。

【０２０８】

別の実施例は、本発明のポリペプチド配列を用いて組織または細胞タイプのプロテオームを分析することに関連する。プロテオームの語は、特定の組織または細胞タイプでのタンパク質発現の包括的パターンを指す。プロテオームの各タンパク質成分は、個々に更に分析の対象とすることができる。プロテオーム発現パターン即ちプロフィールは、所与の条件下で所与の時間に発現したタンパク質の数及び相対存在量を定量することにより分析し得る。従って細胞のプロテオームのプロフィールは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、１次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、２次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような２次元ゲル電気泳動により分離が達成される（前出のＳｔｅｉｎｅｒ および Ａｎｄｅｒｓｏｎ）。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたは銀染色液または蛍光染色液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、独自の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クエンシングする。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。

【０２０９】

プロテオームのプロファイルは、ＡＤＧＵＣに特異的な抗体を用いてＡＤＧＵＣ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．Ｂｉｏｃｈｅｒｎ．２７０：１０３－１１１、Ｍｅｎｄｏｚｅ，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。

【０２１０】

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プロテオームのプロフィールを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性シグネチャは有用たり得る。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、プロテオームのプロフィール作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【０２１１】

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クエンシングし、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。

【０２１２】

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。

【０２１３】

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他の（１９９５）ＰＣＴ出願第ＷＯ９５／２５１１６号、Ｓｈａｌｏｎ，Ｄ．他の（１９９５）ＰＣＴ出願第ＷＯ９５／３５５０５号、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｒ．Ａ．他（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４：２１５０－２１５５、Ｈｅｌｌｅｒ，Ｍ．Ｊ．他の（１９９７）米国特許第５，６０５，６６２号等を参照）。

様々なタイプのマイクロアレイが公知であり、詳細については、ＤＮＡ Ｍｉｃｒｏａｒｒａｙｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，Ｍ．Ｓｃｈｅｎａ，編集．（１９９９）Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎに記載されている。該文献は、特に引用することを以って本明細書の一部となす。

【０２１４】

本発明の別の実施例ではまた、ＡＤＧＵＣ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、コード配列より非コード配列の方が好ましい。例えば、多重遺伝子ファミリーのメンバー内でのコード配列の保存により、染色体マッピング中に望ましくないクロスハイブリダイゼーションが生じる可能性がある。核酸配列は、特定の染色体、染色体の特定領域または人工形成の染色体、例えば、ヒト人工染色体（ＨＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、細菌Ｐ１産物、或いは単一染色体ｃＤＮＡライブラリに対してマッピングされる（例えば、Ｈａｒｒｉｎｇｔｏｎ，Ｊ．Ｊ．他（１９９７）Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．１５：３４５－３５５；Ｐｒｉｃｅ，Ｃ．Ｍ．（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．７：１２７１３４；およびＴｒａｓｋ，Ｂ．Ｊ．（１９９１）Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔ．７：１４９１５４を参照。）一度マッピングすると、本発明の核酸配列を用いて例えば病状の遺伝を特定の染色体領域の遺伝または制限酵素断片長多型（ＲＦＬＰ）と相関させるような遺伝子連鎖地図を発生させ得る。（例えば、Ｌａｎｄｅｒ，Ｅ．Ｓ．およびＤ．Ｂｏｔｓｔｅｉｎ（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：７３５３－７３５７を参照。）

蛍光ｉｎ ｓｉｔｕ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（前出のＨｅｉｎｚ－Ｕｌｒｉｃｈ，他（１９９５）ｉｎ Ｍｅｙｅｒｓ，９６５－９６８ページ．等を参照）遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはＯｎｌｉｎｅ Ｍｅｎｄｅｌｉａｎ Ｉｎｈｅｒｉｔａｎｃｅ ｉｎ Ｍａｎ（ＯＭＩＭ）のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上のＡＤＧＵＣをコードする遺伝子の位置と、特定の疾患との相関性、あるいは特定の疾患に対する素因との相関性は、この疾患と関連するＤＮＡの領域の決定に役立ち得るため、位置を決定するクローニングの作業を促進し得る。

【０２１５】

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置ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体上の遺伝子座が未知でも、関連するマーカー類をしばしば明らかにし得る。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探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群に関与する遺伝子が、血管拡張性失調症の１１ｑ２２－２３領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域にマップされた任意の配列は、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を提示している可能性がある（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。

【０２１６】

本発明の別の実施例では、任意の種々の薬剤スクリーニング技術を以って化合物のライブラリをスクリーニングするために、ＡＤＧＵＣ、ＡＤＧＵＣの触媒作用断片、免疫原断片、またはそのオリゴペプチドを用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになろう。ＡＤＧＵＣと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定可能である。

【０２１７】

別の薬剤スクリーニング方法は、目的のタンパク質に対して好適な結合親和性を有する化

合物を高い処理能力でスクリーニングするために用いられる（Ｇｅｙｓｅｎ，他（１９８４）ＰＣＴ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ 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、ＡＤＧＵＣ、或いはその断片と反応してから洗浄される。次ぎに、結合されたＡＤＧＵＣが、当分野で周知の方法で検出される。 精製されたＡＤＧＵＣはまた、前記した薬剤をスクリーニングする技術に用いられるプレート上で直接被覆することもできる。別法では、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、ペプチドを固体支持物に固定することもできる。

【０２１８】

別の実施例では、ＡＤＧＵＣと結合可能な中和抗体がＡＤＧＵＣ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、ＡＤＧＵＣ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。

【０２１９】

別の実施例では、将来に開発される分子生物学技術が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、ＡＤＧＵＣをコードするヌクレオチド配列をその新技術に用い得る。

【０２２０】

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。

【０２２１】

本明細書において開示した全ての特許、特許出願及び刊行物、特に米国特許第６０／２５７，１９３号、および第６０／２６０，１１１号は言及することをもって本明細書の一部となす。

（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る。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、塩化セシウムで遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からＲＮＡを沈殿させた。

【０２２２】

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、ＤＮＡ分解酵素で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，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ ＣＡ）またはＯＬＩＧＯＴＥＸ ｍＲＮＡ精製キット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、ポリ（Ａ＋） ＲＮＡを単離した。別法では、別のＲＮＡ単離キット、例えばＰＯＬＹ（Ａ）ＰＵＲＥ ｍＲＮＡ精製キット（Ａｍｂｉｏｎ，Ａｕｓｔｉｎ ＴＸ）を用いて組織溶解物からＲＮＡを直接単離した。

【０２２３】

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，１９９７，５．１－６．６ユニット等を参照）。逆転写は、オリゴｄ（Ｔ）またはランダムプライマーを用いて開始した。合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖ｃＤＮＡに連結反応させ、好適な制限酵素でｃＤＮＡを消化した。殆どのライブラリに対して、ｃＤＮＡのサイズ（３００～１０００ｂｐ）選択は、ＳＥＰＨＡＣＲＹＬ Ｓ１０００、ＳＥＰＨＡＲＯＳＥ ＣＬ２ＢまたはＳＥＰＨＡＲＯＳＥ ＣＬ４Ｂカラムクロマトグラフィー（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、或いは調製用アガロースゲル電気泳動法を用いて行った。 合成オリゴヌクレオチドアダプターを二本鎖ｃＤＮＡに連結反応させ、好適な制限酵素または酵素でｃＤＮＡを消化した。 好適なプラスミドは、例えばＰＢＬＵＥＳＣＲＩＰＴプラスミド（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ＰＳＰＯＲＴ１ プラスミド（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＰＣＤＮＡ２．１ プラスミド （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）、ＰＢＫ－ＣＭＶ プラスミド （Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ＰＣＲ２－ＴＯＰＯＴＡプラスミド （Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＰＣＭＶ－ＩＣＩＳプラスミド （Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＩＧＥＮ （Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）、ｐＲＡＲＥ （Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）、ｐｌＮＣＹ（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）等およびその誘導体である。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ＤＨ５α、ＤＨ１０ＢまたはＥＬＥＣＴＲＯＭＡＸ ＤＨ１０Ｂを含む大腸菌細胞に形質転換した。

【０２２４】

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。プラスミドを精製する方法は、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およびＱＩＡＷＥＬＬ ８ Ｕｌｔｒａ Ｐｌａｓｍｉｄ 精製システム、Ｒ．Ｅ．Ａ．Ｌ．Ｐｒｅｐ ９６プラスミド精製キットの中から少なくとも１つを用いた。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。

【０２２５】

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

【０２２６】

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 ＰＲ

ＩＳＭ 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。

【０２２７】

Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列に由来するポリヌクレオチド配列は、ベクター、リンカー及びポリ（Ａ）配列を除去し、あいまいな塩基対をマスクすることによって有効性を確認した。 その際、ＢＬＡＳＴ、動的プログラミング及び隣接ジヌクレオチド頻度分析に基づくアルゴリズム及びプログラムを用いた。ＩｎｃｙｔｅのｃＤＮＡ配列、またはその翻訳を公共のデータベース（例えばＧｅｎＢａｎｋの霊長類及びげっ歯類、哺乳動物、脊椎動物、真核生物のデータベースと、ＢＬＯＣＫＳ、ＰＲＩＮＴＳ、ＤＯＭＯ、ＰＲＯＤＯＭ、ＰＲＯＴＥＯＭＥデータベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ ＣＡ）（ヒト、ラット、マウス、線虫、酵母、分裂酵母、及び鵞口瘡カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ ａｌｂｉｃａｎｓ）の配列を含む ）、およびＰＦＡＭ等隠れマルコフモデル（ＨＭＭ）ベースのタンパク質ファミリーデータベース）に対して問い合わせた（ＨＭＭは、遺伝子ファミリーのコンセンサス１次構造を分析する確率的アプローチである。Ｅｄｄｙ，Ｓ．Ｒ．（１９９６）Ｃｕｆｆ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．６：３６１－３６５等を参照）。問合せは、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＩＭＰＳ及びＨＭＭＥＲに基づくプログラムを用いて行った。Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列は、完全長のポリヌクレオチド配列を産出するように構築された。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、ＰＲＯＴＥＯＭＥデータベース、ＢＬＯＣＫＳ、ＰＲＩＮＴＳ、ＤＯＭＯ、ＰＲＯＤＯＭ及びＰｒｏｓｉｔｅ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。

【０２２８】

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（スコアが高いほど、または確率値が低いほど、２配列間の相同性が高くなる）。

【０２２９】

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２に示した。

【０２３０】

４　ゲノムＤＮＡからのコード配列の同定及び編集

推定上のアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼは、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した。Ｇｅｎｓｃａｎは、様々な生物からのゲノム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）Ｃｕｒｒ．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、どの配列がアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼ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モデルにおいてアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼについて問合せて分析した。Ｉｎｃｙｔｅ ｃＤＮＡ配列の相同体をアデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼとして注釈を付けてきたことにより、潜在的アデニリルシクラーゼ及びグアニリルシクラーゼも同定した。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。

【０２３１】

５　ｃＤＮＡ配列データを使ったゲノム配列データの構築

ステッチ配列（Ｓｔｉｃｈｅｄ 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間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、１つのｃＤＮＡ及び２つのゲノム配列に間隔が存在する場合、３つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列をｃＤＮＡ配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列（ｐａｒｅｎｔ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合

わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。１種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖（ｃＤＮＡ－ｃＤＮＡまたはゲノム配列－ゲノム配列）は、親の種類を変える連鎖（ｃＤＮＡ－ゲノム配列）に優先した。結果として得られるステッチ配列は、ＢＬＡＳＴ分析により公共データベースｇｅｎｐｅｐｔ及び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。

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。

【０２３２】

６　ＡＤＧＵＣ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（表７）などの構築アルゴリズムを使用して、連続的配列及びオーバーラップ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決定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている場合は、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。

【０２３３】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体のｐアームの末端に関連して測定する。（センチモルガン（ｃＭ）は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、１ｃＭは、ヒト中のＤＮＡの１メガベース（Ｍｂ）にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する。）ｃＭ距離は、配列が各クラスタ内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなＧｅｎｅｔｈｏｎによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。ＮＣＢＩ「ＧｅｎｅＭａｐ９９」（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。

【０２３４】

７　ポリヌクレオチド発現の分析

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

ｓｕｂｅｌ．Ｆ．Ｍ．他，４章及び１６章等を参照）。

【０２３５】

ＢＬＡＳＴを適用した類似のコンピュータ技術を用いて、ＧｅｎＢａｎｋやＬｉｆｅＳｅｑ（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）等のｃＤＮＡデータベースにおいて同一または関連分子を検索した。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否かを決定するため、コンピュータ検索の感度を変更することができる。検索の基準は積スコアであり、次式で定義される。

【０２３６】

【数１】

$$\frac{(\text{BLAST スコア}\times\text{配列一致率})}{5\times(\text{長さ(配列1)，長さ(配列2)})\text{の最小値}}$$

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、断片的オーバーラップと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％オーバーラップしているか、他端が８８％一致し、１００％オーバーラップ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％オーバーラップしているか、他端が７９％一致し、１００％オーバーラップしているかのいずれかの場合に得られる。

【０２３７】

或いは、ＡＤＧＵＣ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オーバーラップ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、以下の生物／組織カテゴリー即ち心血管系、結合組織、消化器系、胎芽構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液及び免疫系、肝、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器、皮膚、顎口腔系、非分類性／混合性または尿路の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。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患／病状カテゴリー即ち癌、細胞株、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、プール、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、ＡＤＧＵＣをコードするｃＤＮＡの疾患特異的な発現と組織を反映する。 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。

【０２３８】

８　ポリヌクレオチドをコードするＡＤＧＵＣの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて生成した。一方のプライマーは既知の断片の５’伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の３’伸長を開始するべく合成した。開始プライマーは、長さが約２２～３０ヌクレオチド、ＧＣ含有率が約５０％以上となり、約６８～７２℃の温度で標的配列にアニーリングするように、ＯＬＩ

ＧＯ ４．０６ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）或いは別の適切なプログラムを用いて、ｃＤＮＡから設計した。 ヘアピン構造及びプライマー－プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの伸長は全て回避した。

【０２３９】

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。

【０２４０】

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ウェルプレート内で行った。反応混合液は、鋳型ＤＮＡ及び２００ ｎｍｏｌの各プライマー、Mg^{2+}と$(NH_4)_2SO_4$とβ－メルカプトエタノールを含むバッファー、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、ＥＬＯＮＧＡＳＥ酵素（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、Ｐｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を含む。 プライマーの組、ＰＣＩ ＡとＰＣＩ Ｂに対して以下のパラメータで増幅を行った。ステップ１： ９４℃で３分間 ステップ２： ９４℃で１５秒 ステップ３： ６０℃で１分間 ステップ４： ６８℃で２分間 ステップ５： ステップ２、３、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。 プライマー対Ｔ７、ＳＫ＋に対しては、上記パラメータに代えて以下のパラメータを用いた。 ステップ１： ９４℃で３分間 ステップ２： ９４℃で１５秒 ステップ３： ５７℃で１分間 ステップ４： ６８℃で２分間 ステップ５： ステップ２、３、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。

【０２４１】

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ＰＩＣＯＧＲＥＥＮ定量試薬（０．２５％（ｖ／ｖ） ＰＩＣＯＧＲＥＥＮ；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。

【０２４２】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して３８４ウェルプレートに移し、ＣｖｉＪＩコレラウイルスエンドヌクレアーゼ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ, Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ）を用いて消化し、ｐＵＣ １８ベクター（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）への再連結反応前に音波処理またはせん断した。ショットガン・シークエンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度（０．６～０．８％）のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をＡｇａｒ ＡＣＥ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で消化した。伸長させたクローンをＴ４リガーゼ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ, Ｂｅｖｅｒｌｙ ＭＡ）を用いてｐＵＣ １８ベクター（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）に再連結し、Ｐｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）で処理して制限部位の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／２Ｘカルベニシリン培養液の３８４ウェルプレートに３７℃で一晩培養した。

【０２４３】

細胞を溶解して、Ｔａｑ ＤＮＡポリメラーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）及びＰｆｕ ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて以下の手順でＤＮＡをＰＣＲ増幅した。ステップ１ ９４℃で３分間 ステップ２ ９４℃で

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

【０２４４】

同様に、上記手順を用いて完全長ポリ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。

【０２４５】

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から導き出された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５０ｐｍｏｌと、［γ－^{32}Ｐ］アデノシン３リン酸（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）２５０μＣｉ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、Ｘｂａ１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10^{7}カウントの標識されたプローブを含むアリコットを用いる。

【０２４６】

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×クエン酸ナトリウム食塩水及び０．５％ドデシル硫酸ナトリウムに一致する条件下で、ブ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。

【０２４７】

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Ｂａｌｄｅｓｃｈｗｅｉｌｅｒ等を参照）、機械的マイクロスポッティング技術及びこれらから派生したものを用いて達成することが可能である。上記各技術において基板は、均一且つ非多孔性の固体とするべきである（Ｓｃｈｅｎａ （１９９９） 前出）。推奨する基板には、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、ドットブロット法またはスロットブ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（Ｓｃｈｅｎａ，Ｍ．他（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０：４６７－４７０、Ｓｈａ

lon. D. 他（1996）Genome Res. 6：639－645、Marshall, A. およびJ. Hodgson（1998）Nat. Biotechnol. 16：27－31. を参照）。

【0248】

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。

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、0.05pg／μlのオリゴ（dT）プライマー（21mer）、1×第一鎖合成バッファー、0.03unit／μlのRNA分解酵素阻害因子、500μMのdATP、500μMのdGTP、500μMのdTTP、40μMのdCTP、40μM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）を用いてポリ（A）$^+$ RNA 200 ng 含有の25体積ml内で行う。特異的対照ポリ（A）$^+$ RNAは、非コード酵母ゲノムDNAからin vitro転写により合成する。37℃で2時間インキュベートされた後、各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5mlの0.5M水酸化ナトリウムで処理し、85℃で20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム（CLONTECH Laboratories, Inc.（CLONTECH）, Palo Alto CA）を用いて精製する。 混合後、2つの反応サンプルは、1mlのグリコーゲン（1mg／ml）、60mlの酢酸ナトリウム及び300ml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., Holbrook NY）を用いて乾燥して仕上げ、14μlの5×SSC／0.2％SDS中で再懸濁する。

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、1～2ngの初期量から5μg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（Amersham Pharmacia Biotech）を用いて精製される。

【0249】

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グラス上に固定する。顕微鏡スライドグラス（Corning）は、処理中及び処理後に0.1％のSDS及びアセトン中で超音波処理をかけ、蒸留水で非常に良く洗浄する。スライドグラスは、4％フッ化水素酸（VWR Scientific Products Corporation（VWR）, West Chester PA）中でエッチングし、蒸留水中で非常に良く洗浄し、95％エタノール中で0.05％アミノプロピルシラン（Sigma）を用いて

コーティングする。コーティングしたスライドガラスは、１１０℃のオブンで硬化させる。

【０２５０】

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１００ｎｇ／μｌのアレイエレメントＤＮＡ１μｌを高速機械装置により開放型キャピラリープリンティングエレメント（ｏｐｅｎ ｃａｐｉｌｌａｒｙ ｐｒｉｎｔｉｎｇ ｅｌｅｍｅｎｔ）に充填する。装置はここで、スライド毎に約５ｎｌのアレイエレメントサンプルを加える。

【０２５１】

マイクロアレイには、ＳＴＲＡＴＡＬＩＮＫＥＲ ＵＶ架橋剤（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いてＵＶ架橋する。マイクロアレイは、室温において０．２％ＳＤＳで１度洗浄し、蒸留水で３度洗浄する。リン酸緩衝生理食塩水 （ＰＢＳ）（Ｔｒｏｐｉｘ，Ｉｎｃ．，Ｂｅｄｆｏｒｄ ＭＡ）中の０．２％カゼイン中において６０℃で３０分間マイクロアレイをインキュベートした後、前に行ったように０．２％ＳＤＳ及び蒸留水で洗浄することにより、非特異結合部位をブロックする。

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応液は、５×ＳＳＣ、０．２％ＳＤＳハイブリダイゼーション緩衝液にＣｙ３及びＣｙ５標識したｃＤＮＡ合成産物を各０．２μｇ含む９μｌ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℃まで５分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して１．８ｃｍ^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１４０μｌの５×ＳＳＣを加えることにより、チェンバー内部を湿度１００％に保持する。アレイを含むチェンバーは、６０℃で約６．５時間インキュベートする。アレイは、第１洗浄緩衝液中（１×ＳＳＣ，０．１％ＳＤＳ）において４５℃で１０分間洗浄し、第２洗浄緩衝液中（０．１×ＳＳＣ）において４５℃で１０分間各々３度洗浄して乾燥させる。

検出

レポーター標識ハイブリダイゼーション複合体は、Ｃｙ３の励起のためには４８８ｎｍ、Ｃｙ５の励起のためには６３２ｎｍでスペクトル線を発生し得るＩｎｎｏｖａ７０混合ガス１０Ｗレーザ（Ｃｏｈｅｒｅｎｔ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ ＣＡ）を備えた顕微鏡で検出する。２０×顕微鏡対物レンズ（Ｎｉｋｏｎ，Ｉｎｃ．，Ｍｅｌｖｉｌｌｅ ＮＹ）を用いて、アレイ上に励起レーザ光の焦点を当てる。アレイを含むスライドを顕微鏡のコンピュータ制御のＸ－Ｙステージに置き、対物レンズを通過してラスタースキャンする。本実施例で用いた１．８ｃｍ×１．８ｃｍのアレイは、２０μｍの解像度でスキャンした。

【０２５２】

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、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。

【０２５３】

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較正する。アレイ上の特定の位置には相補的ＤＮＡ配列が含まれ、その位置におけるシグナルの強度を重量比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つの蛍光色素で較正するｃＤＮＡのサンプルを標識し、ハイブリダイゼーション混合液に各々等量を加えることによって較正を行う。

【０２５４】

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

【０２５５】

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。

【０２５６】

１１　相補的ポリヌクレオチド

ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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。ＯＬＩＧＯ ４．０６ソフトウェア（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）とＡＤＧＵＣをコードする配列とを用いて、適切なオリゴヌクレオチドを設計する。転写を阻害するためには、最も独特な５’配列から相補的オリゴヌクレオチドを設計し、これを用いてプロモーターがコーディング配列に結合するのを阻害する。翻訳を阻害するためには、相補的なオリゴヌクレオチドを設計して、リボソームがＡＤＧＵＣをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【０２５７】

１２　ＡＤＧＵＣの発現

ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣを発現するために、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する。このようなプロモーターには、ｌａｃオペレーター調節因子に関連するＴ５またはＴ７バクテリオファージプロモーター及びｔｒｐ－ｌａｃ（ｔａｃ）ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、ＢＬ２１（ＤＥ３）等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピルβ－Ｄチオガラクトピラノシド（ＩＰＴＧ）で誘発されるとＡＤＧＵＣを発現する。真核細胞でのＡＤＧＵＣ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ス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、ＡＤＧＵＣ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）。

【０２５８】
殆どの発現系では、ＡＤＧＵＣ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２６ｋＤａ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）。精製後、ＧＳＴの部分を特定の開発部位においてＡＤＧＵＣからタンパク分解的に切断することが可能である。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ＡＤＧＵＣを直接用いて以下の実施例１６、１７、及び１８のアッセイを行うことができる。

【０２５９】
１３　機能的アッセイ
ＡＤＧＵＣ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ＡＤＧＵＣ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ｐＣＲ ３．１プラスミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）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、５～１０μｇ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１～２μｇ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、ブ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ンク質の発現の変化、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。

【０２６０】
遺伝子発現におけるＡＤＧＵＣの影響は、ＡＤＧＵＣ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か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。ＡＤＧＵＣ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。

【０２６１】

１４　ＡＤＧＵＣ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ＴＲＩＣＨ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。

【０２６２】

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

【０２６３】

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ＡＤＧＵＣ活性を検査するには、ペプチドまたはＡＤＧＵＣ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。

【０２６４】

１５　特異的抗体を用いる天然ＡＤＧＵＣの精製

天然または組換えＡＤＧＵＣを、ＡＤＧＵＣ特異抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティーカラムは、抗ＡＤＧＵＣ抗体を活性化クロマトグラフィー用樹脂、例えばＣＮＢｒ活性化セファロース（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ）と共有結合させることにより構築する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【０２６５】

ＡＤＧＵＣを含む培養液をイムノアフィニティーカラムに通し、ＡＤＧＵＣを優先的に吸着する条件下（例えば洗浄剤が存在する高イオン強度緩衝液）でカラムを洗浄する。そのカラムを、抗体とＡＤＧＵＣとの結合を切るような条件で（例えば、ｐＨ２～３のバッファー、或いは高濃度の尿素またはチオシアン酸塩イオンのようなカオトロピック塩で）溶出させ、ＡＤＧＵＣを回収する。

【０２６６】

１６　ＡＤＧＵＣと相互作用する分子の同定

ＡＤＧＵＣまたは生物学的に活性であるＡＤＧＵＣ断片を、^{125}Ｉボルトンハンター試薬で標識する。（例えば Ｂｏｌｔｏｎ Ａ．Ｅ．およびＷ．Ｍ．Ｈｕｎｔｅｒ（１９７３）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．１３３：５２９－５３９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ＡＤＧＵＣと共にインキュベートし、洗浄して、標識したＡＤＧＵＣ複合体を有する全てのウェルをアッセイする。様々なＡＤＧＵＣ濃度で得られたデータを用いて、候補分子と結合したＡＤＧＵＣの数量及び親和性、会合についての値を計算する。

【０２６７】

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

て分析する。

【０２６８】

ＡＤＧＵＣはまた、ハイスループットな方法で酵母２ハイブリッドシステムを使用するＰＡＴＨＣＡＬＬＩＮＧプロセス（ＣｕｒａＧｅｎ Ｃｏｒｐ．，Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ ＣＴ）に用いて、遺伝子の２大ライブラリにコードされる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．ら（２０００）米国特許第６，０５７，１０１号）。

【０２６９】

１７　ＡＤＧＵＣ活性の実証

ＡＤＧＵＣのアデニリルシクラーゼ活性はＡＴＰをｃＡＭＰに変換する能力により実証される（Ｍｉｔｔａｌ，Ｃ．Ｋ．（１９８６）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１３２：４２２－４２８）。このアッセイＡＤＧＵＣは基質［α－^{32}Ｐ］ＡＴＰと共にインキュベートされ、次に過剰基質が産生物のサイクリック［^{32}Ｐ］ＡＭＰから分離される。ＡＤＧＵＣ活性は、使い捨ての培養試験管（１２ｘ７５ｍｍ）に、ｐＨ７．５の０．６Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌを５μｌ、０．２Ｍ $MgCl_2$ を５μｌ、クレアチン・ホスホキナーゼを３単位含む１５０ｍＭクレアチンリン酸を５μｌ、４．０ｍＭ １－メチル－３－イソブチルキサンチンを５μｌ、２０ｍＭ ｃＡＭＰを５μｌ、２０ｍＭ ジチオスレイトールを５μｌ、１０ｍＭ ＡＴＰを５μｌ、［α－^{32}Ｐ］ＡＴＰ（２－４ｘ10^6 ｃｐｍ）を１０μｌ、および水を含む合計量１００μｌの溶液中で決定する。この反応混合液は前もって３０℃に温められる。反応はＡＤＧＵＣを前もって温められた反応混合液に添加することにより開始する。３０℃で１０～１５分インキュベートした後、反応は３０％のよく冷やしたトリクロロ酢酸（ＴＣＡ）を２５μｌ加えることにより終了する。０分インキュベーションした反応液とＡＤＧＵＣ不在でインキュベートした反応液はネガティブコントロールとして使用される。産物はイオン交換クロマトグラフィにより分離される。またサイクリック［^{32}Ｐ］ＡＭＰはβラジオアイソトープカウンタを使用して定量化される。ＡＤＧＵＣ活性は、反応中に形成されるサイクリック［^{32}Ｐ］ＡＭＰの量に比例する。

【０２７０】

ＡＤＧＵＣのグアニリルシクラーゼ活性はＧＴＰをｃＧＭＰに変換する能力により実証される（前出のＭｉｔｔａｌ）。このアッセイＡＤＧＵＣは基質［α－^{32}Ｐ］ＧＴＰと共にインキュベートされ、次に過剰基質が産生物のサイクリック［^{32}Ｐ］ＧＭＰから分離される。反応混合液は、ｐＨ７．５の１Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌを５μｌ、８０ｍＭ $MnCl_2$ あるいは $MgCl_2$ を５μｌ、４０ｍＭ テオフィリンあるいは２．０ｍＭ １－メチル－３－イソブチルキサンチンを２５μｌ、２０μｇ のクレアチン・ホスホキナーゼ（１２０～１３５ 単位／ｍｇ タンパク質）を含む１５０ｍＭ クレアチンリン酸を５μｌ、２０ｍＭ ｃＧＭＰを５μｌ、１０ｍＭ ＧＴＰを１０μｌ、［α－^{32}Ｐ］ＧＴＰ（２－４ｘ10^6 ｃｐｍ含有）を１０μｌ、および水を含む合計量１００μｌの溶液である。反応はＡＤＧＵＣの添加によって開始される。３７℃で１０～１５分インキュベートした後、反応は４０％のよく冷やしたトリクロロ酢酸を２０μｌ加えることにより終了する。０分インキュベーションした反応液とＡＤＧＵＣ不在でインキュベートした反応液はネガティブコントロールとして使用される。産物はイオン交換クロマトグラフィにより分離される。またサイクリック［^{32}Ｐ］ＧＭＰはβ－ラジオアイソトープカウンタを使用して定量化される。ＡＤＧＵＣ活性は、反応中に形成されるサイクリック［^{32}Ｐ］ＧＭＰの量に比例する。

【０２７１】

１８　ＡＤＧＵＣアゴニスト及びアンタゴニストの同定

ＡＤＧＵＣ活性化または抑制のアゴニストまたはアンタゴニストは、実施例１７で記述したアッセイを使用してテストしてもよい。またはサイリックＡＭＰ ＦｌａｓｈＰｌａｔｅ ＡｓｓａｙとサイリックＧＭＰ ＦｌａｓｈＰｌａｔｅ Ａｓｓａｙ（ＮＥＮ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ）などのマルチウェルプレートフォーマットで高処

理読出しを可能にするアッセイ技術を使用するアゴニストは、ＡＤＧＵＣ活性の増加を引き起こし、アンタゴニストはＡＤＧＵＣ活性の減少を引き起こす。

【０２７２】

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

（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。

【０２７３】

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相同体が一致する確率スコアも併せて示す。

【０２７４】

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。

【０２７５】

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。

【０２７６】

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。

【０２７７】

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。

【０２７８】

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	ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte ポリヌクレオチド ID
5678557	1	5678557CD1	3	5678557CB1
7474459	2	7474459CD1	4	7474459CB1

【表２】

表２

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	確率 スコア	GenBank 相同体
1	5678557CD1	g868201	1.7e-47	アデニル酸シクラーゼに類似[線虫]
2	7474459CD1	g1504042	2.5e-126	酵母のアデニル酸シクラーゼに類似(S56776)[ヒト]。 Nagase, T. 他 (1996) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. DNA Res. 3:321-329.

【表３】

表３

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法およびデータベース
1	5678557CD1	239	S129 S145 S149 S169 T234 Y224		ロイシンリッチリピート: N39-T62, K86-S108, L63-K85, A109-R131, R177-Q202, Q154-P176, H132-G151	HMMER-PFAM
					ロイシンリッチリピートシグネチャ PR00019: L40-L53, L84-L97	BLIMPS-PRINTS
					酵母アデニル酸シクラーゼ触媒部位: DM02017|Q09564|466-564: L64-E157 (P 値 = 6.6e-7)	BLAST-DOMO
2	7474459CD1	814	Y117, S161, S162, T180, T198, T239, S361, S364, S396, T450, S455, S459, S548, S559, S570, S595, S637, T652, Y677, S766	N81, N320	シグナル切断: M1-G60	SPSCAN
					ロイシンリッチリピート: S672-S694, G695-Q717, N718-R740, K741-R763, K649-R671, A624-Q645, A764-G786, A601-G623	HMMER-PFAM
					膜貫通ドメイン: W42-Q64, A128-K156, M272-F300, H325-Y350; N 末端は細胞質ではない	TMAP
					ロイシンリッチリピートシグネチャ: PR00019: L673-L686	BLIMPS-PRINTS

【表４】

表 4

ポリヌクレオチド SEQ ID NO/ Incyte ポリヌクレオチド ID/ 配列長	配列断片
3/5678557CB1/1420	1-237, 1-660, 3-237, 4-478, 4-509, 5-237, 6-237, 6-336, 15-645, 15-679, 16-264, 16-359, 16-379, 16-390, 16-489, 16-515, 16-569, 16-574, 16-608, 16-610, 16-618, 16-650, 16-659, 16-673, 16-701, 18-514, 18-631, 18-647, 21-256, 22-237, 22-269, 22-359, 22-437, 22-680, 23-237, 23-252, 24-237, 30-321, 30-586, 43-769, 48-197, 48-237, 50-741, 73-237, 75-780, 91-237, 96-235, 113-237, 209-477, 209-852, 403-1075, 449-1050, 461-1336, 483-1190, 487-665, 487-1020, 495-1087, 512-1089, 521-1256, 552-740, 562-1230, 564-1304, 586-1258, 587-1262, 604-734, 609-1243, 635-1132, 658-1247, 672-1306, 733-1271, 745-1404, 769-1061, 777-1309, 783-1420, 792-1251, 799-1420, 829-1240, 918-1352, 921-1412, 926-1420, 1034-1282, 1129-1289
4/7474459CB1/3278	1-2445, 49-586, 106-686, 106-766, 193-561, 472-1124, 590-1124, 701-1346, 1123-1781, 1211-1924, 1320-2129, 1702-2364, 1715-1939, 2015-2592, 2063-2692, 2064-2561, 2140-2823, 2425-2683, 2425-3256, 2544-3202, 2637-3019, 2671-3278, 2695-3172, 2704-3136, 2763-3044, 2855-3186, 2894-3158, 2956-3246

【表 5】

表５

ポリヌクレオチド SEQ ID NO:	Incyte プロジェクト ID	代表的ライブラリ
3	5678557CB1	PLACFER06
4	7474459CB1	UTRCDIE01

【表６】

表 6

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
PLACFER06	pINCY	このランダムプライムされたライブラリは胎児性死亡および水頭症で妊娠 16 週目に死亡した白人胎児から採取した胎盤組織から単離した RNA を用いて作製した。患者の病歴には、頭(3回)冶および唇(1 回)に臍帯が巻きついていたことが含まれる。血清学は抗 CMV に陽性であった。家族歴には複数の妊娠、生児出産および妊娠中絶がある。
UTRCDIE01	PCDNA2.1	このSに帰って、ランダムプライムされたライブラリは、29 歳白人女性の膣式子宮摘出術および膀胱瘤修復術時に摘出された子宮頸組織から単離した RNA を用いて作製した。病理検査は、扁平上皮異常形成を伴う軽度の慢性子宮頸管炎を示した。一致する腫瘍組織の病理学検査では、子宮膜内平滑筋腫が見られた。患者の病歴は、甲状腺機能低下症、骨盤底弛緩、対麻痺、自己カテーテル法を示した。以前に受けた手術には、正常分娩、椎弓切除術、鼻形成術がある。患者の使用薬剤には Synthroid がある。家族の病歴としては、父親に良性高血圧症、母親にタイプIIの糖尿病と高脂質血症があった。

【表 7】

【表８】

表７－１

プログラム	説明	引用文献	パラメータ閾値
ABI FACTURA	ベクター配列を除き、核酸配列のまぎらわしい塩基を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シックローカルアラインメント検索ツール（Basic Local Alignment Search Tool）。BLASTには5つの機能がある：blastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastx。	Altschul, S.F. 他 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. 他 (1997) (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	*ESTs*:確率値=1.0E-8以下 完全長配列:確率値= 1.0E-10以下
FASTA	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は最低5つの機能からなる：fasta、tfasta、fastx、tfastxおよびssearch。	Pearson, W.R.及びD.J. Lipman (1988) Proc. Natl. Acad Sci.USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol.183:63-98; およびSmith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	*ESTs*:fasta E 値=1.06E-6 *構築された ESTs*: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、配列相同性および構造的フィンガープリント領域を検索するBLocks IMProved Searcher	Henikoff, S.及びJ.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res.19:6565-6572; Henikoff, J.G.及びS. Henikoff (1996) Methods Enzymol.266:88-105、Attwood, T.K. 他. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値= 1.0E-3以下
HMMER	問合せ配列をPFAMのようなタンパク質ファミリ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; Sonnhammer, 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	パラメータ閾値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol.183:146-159; Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質スコア≧特定のPrositeモチーフに対するGCG指定「HIGH」値 通常、スコア=1.4～2.1.
Phred	高度感受性および確立性のある自動シークエ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の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ャンし、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. 及び S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	重量マトリックスを使ってタンパク質配列上の膜貫通部分を描写し、方向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM) を使って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。175-182.	
Motifs	Prositeで定義されたものと一致するパターンのアミノ酸配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, バージョン9, M51-59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
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059286 A2

(51) International Patent Classification[7]: C12N 9/00

(21) International Application Number: PCT/US01/49212

(22) International Filing Date:
18 December 2001 (18.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/257,193 19 December 2000 (19.12.2000) US
60/260,111 5 January 2001 (05.01.2001) 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)*: **BAUGHN, Mariah** [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). **TRIBOULEY, Catherine, M.** [FR/US]; 1121 Tennessee Street, #5, San Francisco, CA 94107 (US). **WALIA, Narinder, K.** [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). **LU, Yan** [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (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, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, 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 02/059286 A2

(54) **Title:** ADENYLYL AND GUANYLYL CYCLASES

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

ADENYLYL AND GUANYLYL CYCLASES

TECHNICAL FIELD

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of adenylyl and guanylyl cyclases and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of neurological, cardiovascular, vision, reproductive, and smooth muscle disorders, and bacterial infections, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of adenylyl and guanylyl cyclases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

An essential role in intracellular signaling pathways is filled by second messenger molecules, intermediaries that are activated upon binding of ligands to surface receptors and serve as activators of downstream effector molecules. The cyclic nucleotides, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) and guanosine 3'5'-cyclic monophosphate (cGMP) are critical second messengers in a wide variety of signaling pathways. cAMP and cGMP are generated by the enzymes adenylyl (adenylate) cyclase (AC) and guanylyl (guanylate) cyclase (GC) from ATP and GTP. Thus a key step in regulating intracellular cAMP and cGMP levels is modulation of AC and GC activity.

There are nine known isoforms of mammalian AC. All share a common structure comprising a small cytoplasmic N-terminal domain (N) followed by a membrane spanning domain having six predicted α-helices (M_1), a large cytoplasmic domain (C_1), a second transmembrane helical cluster (M_2), and a second cytoplasmic domain homologous to the first (C_2) (Simonds, W.F. (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:66-73). The C_1 and C_2 domains contain ~230 amino acid regions (C_{1a} and C_{2a}) that share approximately 40% identity and form the enzyme's catalytic core. The remaining portions of the cytoplasmic domains are known as C_{1b} and C_{2b}. The tertiary structures of the C_{1a} and C_{2a} domains consist of a three layer α/β sandwich, with the C_{1a} and C_{2a} domains arranged in a head to tail fashion as a wreath (Tang, W.-J. and J.H. Hurley (1998) Mol. Pharmacol. 54:231-240). All known GC catalytic domains are homologous to the mammalian AC C_1 and C_2 regions and studies suggest that they share the same structure. The transmembrane GCs contain a single transmembrane crossing and a single catalytic domain per protein, and function as homodimers. Soluble GCs function as heterodimers of α and β subunits, with one catalytic domain contributed by each of the two subunits. Leucine repeat sequences are also characteristic of AC and GC polypeptides (Field, J. et al. (1990) Science 247:464-467 and Melchior, F. et al. (1993) Mol. Biol. Cell. 4:569-581).

Mammalian ACs are subjected to complex regulation by G-proteins, Ca^{2+} signals, and phosphorylation (Tang, supra). C_{1a} is the primary binding site for the inhibitory G protein a subunit

($G_{i\alpha}$). C_{2a} is the primary binding site for the stimulatory G protein a subunit ($G_{s\alpha}$) and $G_{\beta\gamma}$, and contains phosphorylation sites for protein kinase (PK) C and calmodulin (CaM) kinase II. C_{1b} is the site of regulation by Ca^{2+}/CaM, Ca^{2+}, PKA, and CaM kinase IV (Tesmer, J.G.G. and S.R. Sprang (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:713-719). The expression patterns and other regulatory properties of the nine AC isoforms vary widely. For example, while AC4, AC7, and AC9 are expressed in a wide range of tissues, AC1 and AC8 are expressed only in neural tissues, while AC5 is expressed predominantly in heart and brain (Simonds, supra). All AC isoforms are activated by $G_{s\alpha}$, but display differential responses to subunits of the $G_{i\alpha}$ and $G_{\beta\gamma}$ families, as well as variable sensitivity to PKs, Ca^{2+}, and CaM. For example, AC1, AC3, and AC8 are strongly stimulated by Ca^{2+}/CaM, while AC5 and AC6 are inhibited by submicromolar concentrations of Ca^{2+} in a CaM-independent manner. AC3, AC5, and AC6 are sensitive to inhibition by $G_{i\alpha}$ while AC2 is not. This heterogeneity allows for tissue- and cell-specific responses to extracellular signals, with integration of signals transmitted by G-proteins with signals from other sources that affect intracellular Ca^{2+} levels and PKC activity (Simonds, supra).

Adenylyl cyclases are key players in intracellular signaling pathways of hormones, neurotransmitters, odorants, and chemokines (Tang, supra). cAMP activates cAMP-dependent protein kinases which modify the activities of specific enzymes in various cell types. By activating cyclic nucleotide-gated ion channels, cAMP can affect the cell membrane potential. cAMP also has various tissue-specific effects. Increased levels of cAMP lead to an increase in triglyceride hydrolysis and a decrease in amino acid uptake in adipose tissue; an increase in conversion of glycogen to glucose, an inhibition of glycogen synthesis, and an increase in gluconeogenesis in liver; an increase in the synthesis of estrogen and progesterone in ovarian follicle; an increase in the synthesis of aldosterone and cortisol in adrenal cortex; an increase in the contraction rate in cardiac muscle cells; conversion of glycogen to glucose in skeletal muscle; secretion of thyroxine in thyroid; an increase in resorption of calcium from bone in bone cells; fluid secretion in intestine; resorption of water in kidney; and an inhibition of aggregation and secretion in blood platelets. (See Lodish, H. et al. (1995) Molecular Cell Biology Scientific American Books, New York NY, pp. 871, 879-886.) The CaM-regulated ACs expressed in brain are important for synaptic plasticity as well as learning and memory. AC1 may also play a role in the regulation of melatonin synthesis (Xia, Z. and D.R. Storm (1997) Curr. Opin. Neurobiol. 7:391-396).

The membrane GCs have extracellular ligand-binding domains at the amino terminus, for which some known ligands are the natriuretic peptides and bacterial enterotoxins. Experiments with knock-out mice reveal that GC-A has a role in heart function and/or development. A form of congenital blindness in humans has been linked to mutations in GC-E. GC-G has high expression in

skeletal muscle and may have a role in regulation of blood flow (Wedel, B.J. and D.L. Garbers (1998) Trends Endocrinol. Metab. 9:213-219). Soluble guanylyl cyclase is associated with heme and activated by nitric oxide. The nitric oxide-soluble guanylyl cyclase-cGMP pathway is widespread in mammalian tissues and important in mediating numerous physiological processes including vascular and non-vascular smooth muscle relaxation, peripheral and central neurotransmission, platelet reactivity, and phototransduction. Overactivity of the nitric oxide-soluble guanylyl cyclase-cGMP pathway may be associated with septic shock and migraine, while underactivity of the pathway may be associated with impotence, hypertension, and asthma (Hobbs, A.J. (1997) Trends Pharmacol. Sci. 18:484-491).

Known inhibitors of ACs include the hypotensive drug forskolin and the P-site inhibitors. If the required specificity could be achieved, cardiac-specific AC inhibitors have been proposed as useful for the treatment of congestive heart failure. As cholera and other serious diarrhoeal diseases result from activation of gastrointestinal ACs and GCs by bacterial toxins, these enzymes would also be useful therapeutic targets (Dessauer, C.W. et al. (1999) Trends Pharmacol. Sci. 20:205-210).

The discovery of new adenylyl and guanylyl cyclases, and the polynucleotides encoding them, satisfies a need in the art by providing new compositions which are useful in the diagnosis, prevention, and treatment of neurological, cardiovascular, vision, reproductive, and smooth muscle disorders, and bacterial infections, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of adenylyl and guanylyl cyclases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, adenylyl and guanylyl cyclases, referred to collectively as "ADGUC" and individually as "ADGUC-1" and "ADGUC-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.

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 complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and optionally, if present, the amount thereof. In one alternative, the probe comprises at least 60 contiguous nucleotides.

The invention further provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: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) 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 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, 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 ADGUC, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

The invention also provides a method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, 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) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting agonist activity in the sample. In one alternative, the invention provides a composition comprising an agonist compound identified by the method and a pharmaceutically acceptable excipient. In another alternative, the invention provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional ADGUC, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2, 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) 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 treating a disease or condition associated with overexpression of functional ADGUC, 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 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 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 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 test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide, b) assessing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound, and c) comparing the activity of the polypeptide in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide.

The invention further provides a method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a 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, b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

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

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 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 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 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.

Table 2 shows the GenBank identification number and annotation of the nearest GenBank homolog for polypeptides of the invention. The probability scores for the matches between each polypeptide and its homolog(s) are 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.

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.

DEFINITIONS

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

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

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

The terms "amino acid" and "amino acid sequence" refer to an oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, or a fragment of any of these, and to naturally occurring or synthetic molecules. Where "amino acid sequence" is recited to refer to a sequence of a naturally occurring 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 ADGUC. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of ADGUC either by directly interacting with ADGUC or by acting on components of the biological pathway in which ADGUC 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 ADGUC 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'-NH_2), 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. 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 ADGUC, 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 ADGUC or fragments of ADGUC may be employed as hybridization probes. The probes may be stored in freeze-dried form and may be associated with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe may be deployed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents (e.g., sodium dodecyl sulfate; SDS), and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, etc.).

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

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

conservative amino acid substitutions.

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

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.

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

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

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

A "fragment" is a unique portion of ADGUC or the polynucleotide encoding ADGUC 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 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 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 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 SEQ ID NO:1-2 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID 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 fragment.

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

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

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

Percent identity between polynucleotide sequences may be determined using the default parameters of the CLUSTAL V algorithm as incorporated into the MEGALIGN version 3.12e sequence alignment program. This program is part of the LASERGENE software package, a suite of molecular biological analysis programs (DNASTAR, Madison WI). CLUSTAL V is described in Higgins, D.G. and P.M. Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 and in Higgins, D.G. et al. (1992) CABIOS 8:189-191. For pairwise alignments of polynucleotide sequences, the default parameters are set as follows: Ktuple=2, gap penalty=5, window=4, and "diagonals saved"=4. The "weighted" residue weight table is selected as the default. Percent identity is reported by CLUSTAL V as the "percent similarity" between aligned polynucleotide sequences.

Alternatively, a suite of commonly used and freely available sequence comparison algorithms is provided by the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410), which is available from several sources, including the NCBI, Bethesda, MD, and on the Internet at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. The BLAST software suite includes various sequence analysis programs including "blastn," that is used to align a known polynucleotide sequence with other polynucleotide sequences from a variety of databases. Also available is a tool called "BLAST 2 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 programs are commonly used with gap and other parameters set to default settings. For example, to compare two nucleotide sequences, one may use blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.12 (April-21-2000) set at default parameters. Such default parameters may be, for example:

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 1

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 and Extension Gap: 2 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 11

Filter: on

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

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

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

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

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

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

Filter: on

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

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

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

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

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

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_0t or R_0t 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 ADGUC 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 ADGUC which is useful in any of the antibody production methods disclosed herein or known in the art.

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

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

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

functional, or immunological properties of ADGUC.

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

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

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

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

"Probe" refers to nucleic acid sequences encoding ADGUC, their complements, or fragments thereof, which are used to detect identical, allelic or related nucleic acid sequences. Probes are isolated oligonucleotides or polynucleotides attached to a detectable label or reporter molecule. Typical labels include radioactive isotopes, ligands, chemiluminescent agents, and enzymes. "Primers" are short nucleic acids, usually DNA oligonucleotides, which may be annealed to a target polynucleotide by complementary base-pairing. The primer may then be extended along the target DNA strand by a DNA polymerase enzyme. Primer pairs can be used for amplification (and identification) of a nucleic acid sequence, e.g., by the polymerase chain reaction (PCR).

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

Methods for preparing and using probes and primers are described in the references, for

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

Oligonucleotides for use as primers are selected using software known in the art for such purpose. For example, OLIGO 4.06 software is useful for the selection of PCR primer pairs of up to 100 nucleotides each, and for the analysis of oligonucleotides and larger polynucleotides of up to 5,000 nucleotides from an input polynucleotide sequence of up to 32 kilobases. Similar primer selection programs have incorporated additional features for expanded capabilities. For example, the PrimOU primer selection program (available to the public from the Genome Center at University of Texas South West Medical Center, Dallas TX) is capable of choosing specific primers from megabase sequences and is thus useful for designing primers on a genome-wide scope. The Primer3 primer selection program (available to the public from the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, Cambridge MA) allows the user to input a "mispriming library," in which sequences to avoid as primer binding sites are user-specified. Primer3 is useful, in particular, for the selection of oligonucleotides for microarrays. (The source code for the latter two primer selection programs may also be obtained from their respective sources and modified to meet the user's specific needs.) The PrimeGen program (available to the public from the UK Human Genome Mapping Project Resource Centre, Cambridge UK) designs primers based on multiple sequence alignments, thereby allowing selection of primers that hybridize to either the most conserved or least conserved regions of aligned nucleic acid sequences. Hence, this program is useful for identification of both unique and conserved oligonucleotides and polynucleotide fragments. The oligonucleotides and polynucleotide fragments identified by any of the above selection methods are useful in hybridization technologies, for example, as PCR or sequencing primers, microarray elements, or specific probes to identify fully or partially complementary polynucleotides in a sample of nucleic acids. Methods of oligonucleotide selection are not limited to those described above.

A "recombinant nucleic acid" is a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two or more otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques such as those described in Sambrook, supra. The term recombinant includes nucleic acids that have

been altered solely by addition, substitution, or deletion of a portion of the nucleic acid. Frequently, a recombinant nucleic acid may include a nucleic acid sequence operably linked to a promoter sequence. Such a recombinant nucleic acid may be part of a vector that is used, for example, to transform a cell.

Alternatively, such recombinant nucleic acids may be part of a viral vector, e.g., based on a vaccinia virus, that could be use 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, 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 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 ADGUC, nucleic acids encoding ADGUC, 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 protein or peptide and an agonist, an antibody, an antagonist, a small molecule, or any natural or synthetic binding composition. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure of the protein, e.g., the antigenic determinant or epitope, recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A," the presence of a polypeptide comprising the epitope A, or the presence of free unlabeled A, in a reaction containing free labeled A and the antibody will reduce the amount of labeled A that binds to the antibody.

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

A "substitution" refers to the replacement of one or more amino acid residues or nucleotides

by different amino acid residues or nucleotides, respectively.

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

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

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

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

A "variant" of a particular nucleic acid sequence is defined as a nucleic acid sequence having at least 40% sequence identity to the particular nucleic acid sequence over a certain length of one of the nucleic acid sequences using blastn with the "BLAST 2 Sequences" tool Version 2.0.9 (May-07-1999) set at default parameters. Such a pair of nucleic acids may show, for example, at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% or greater

sequence identity over a certain defined length. A variant may be described as, for example, an "allelic" (as defined above), "splice," "species," or "polymorphic" variant. A splice variant may have significant identity to a reference molecule, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to 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.

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human adenylyl and guanylyl cyclases (ADGUC), the polynucleotides encoding ADGUC, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of neurological, cardiovascular, vision, reproductive, and smooth muscle disorders, and bacterial infections.

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

Table 2 shows sequences with homology to the polypeptides of the invention as identified by BLAST analysis against the GenBank protein (genpept) database. Columns 1 and 2 show the

polypeptide sequence identification number (Polypeptide SEQ ID NO:) and the corresponding Incyte polypeptide sequence number (Incyte Polypeptide ID) for polypeptides of the invention. Column 3 shows the GenBank identification number (GenBank ID NO:) of the nearest GenBank homolog. Column 4 shows the probability scores for the matches between each polypeptide and its homolog(s). Column 5 shows the annotation of the GenBank homologs along with relevant citations where applicable, all of which are expressly incorporated by reference herein.

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

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of polypeptides of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are adenylyl and guanylyl cyclases. For example, SEQ ID NO:1 is 43% identical to a C. elegans protein similar to adenylate cyclase (GenBank ID g868201) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.7e-47, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:1 also contains a leucine rich repeat as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLAST analyses using the DOMO database provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:1 is an adenylate cyclase. In an alternative example, SEQ ID NO:2 is 51% identical to a putative human adenylate cyclase (GenBank ID g1504042) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 2.5e-126, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:2 also contains leucine-rich repeats, characteristic of adenylyl and guanylyl cyclases, as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS analysis provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:2 contains the characteristic leucine-rich repeats. 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. Column 1 lists the polynucleotide sequence identification number (Polynucleotide SEQ ID NO:), the corresponding Incyte polynucleotide consensus sequence number (Incyte ID) for each polynucleotide of the invention, and the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 2 shows the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences used to assemble the full length polynucleotide sequences of the invention, and of 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.

The polynucleotide fragments described in Column 2 of Table 4 may refer specifically, for example, to Incyte cDNAs derived from tissue-specific cDNA libraries or from pooled cDNA libraries. Alternatively, the polynucleotide fragments described in column 2 may refer to GenBank cDNAs or ESTs which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences. In addition, the polynucleotide fragments described in column 2 may identify sequences derived from the ENSEMBL (The Sanger Centre, Cambridge, UK) database (*i.e.*, those sequences including the designation "ENST"). Alternatively, the polynucleotide fragments described in column 2 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 polynucleotide fragments described in column 2 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching" algorithm. For example, a polynucleotide sequence identified as FL_*XXXXXX*_N_1_N_2_*YYYYY*_N_3_N_4 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 $N_{1,2,3...}$, if present, represent specific exons that may have been manually edited during analysis (See Example V). Alternatively, the polynucleotide fragments in column 2 may refer to assemblages of exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example, a polynucleotide sequence identified as FL*XXXXXX*_g*AAAAA*_g*BBBBB*_1_*N* is a "stretched" sequence, with *XXXXXX* being the Incyte project identification number, g*AAAAA* being the GenBank identification number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching" algorithm was applied, g*BBBBB* 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 (*i.e.*, g*BBBBB*).

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).

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 Table 4 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 ADGUC variants. A preferred ADGUC 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 ADGUC amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of ADGUC.

The invention also encompasses polynucleotides which encode ADGUC. 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 ADGUC. 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 ADGUC.

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 ADGUC. 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 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 ADGUC.

In addition, or in the alternative, a polynucleotide variant of the invention is a splice variant of a polynucleotide sequence encoding ADGUC. A splice variant may have portions which have significant sequence identity to the polynucleotide sequence encoding ADGUC, but will generally have a greater or lesser number of polynucleotides due to additions or deletions of blocks of sequence arising from alternate splicing of exons during mRNA processing. A splice variant may have less than about 70%, or alternatively less than about 60%, or alternatively less than about 50% polynucleotide sequence identity to the polynucleotide sequence encoding ADGUC over its entire length; however, portions of the splice variant will have at least about 70%, or alternatively at least about 85%, or alternatively at least about 95%, or alternatively 100% polynucleotide sequence identity to portions of the polynucleotide sequence encoding ADGUC. Any one of the splice variants described above can encode an amino acid sequence which contains at least one functional or structural characteristic of ADGUC.

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 ADGUC, 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 ADGUC, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode ADGUC and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring ADGUC under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC and ADGUC 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 ADGUC 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 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 ADGUC 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 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 ADGUC may be cloned in recombinant DNA molecules that direct expression of ADGUC, 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 ADGUC.

The nucleotide sequences of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter ADGUC-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 Crameri, A. et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:315-319) to alter or improve the biological properties of ADGUC, such as its biological or enzymatic activity or its ability to bind to other molecules or compounds. DNA shuffling is a process by which a library of gene variants is produced using PCR-mediated recombination of gene fragments. The library is then subjected to selection or screening procedures that identify those gene variants with the desired properties. These preferred variants may then be pooled and further subjected to recursive rounds of DNA shuffling and selection/screening. Thus, genetic diversity is created through "artificial" breeding and rapid molecular evolution. For example, fragments of a single gene containing random point mutations may be recombined, screened, and then reshuffled until the desired properties are optimized. Alternatively, fragments of a given gene may be recombined with fragments of homologous genes in the same gene family, either from the same or different species, thereby maximizing the genetic diversity of multiple naturally occurring genes in a directed and controllable manner.

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

Methods which are well known to those skilled in the art may be used to construct expression vectors containing sequences encoding ADGUC 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 ADGUC. 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 ADGUC. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of ADGUC 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 ADGUC. 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 ADGUC. Transcription of sequences encoding ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC in cell lines is preferred. For example, sequences encoding ADGUC can be transformed into cell lines using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for about 1 to 2 days in enriched media before being switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to a selective agent, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be propagated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

Any number of selection systems may be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase and adenine phosphoribosyltransferase genes, for use in *tk* and *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), ß glucuronidase and its substrate ß-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 ADGUC is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences encoding ADGUC can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding ADGUC 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 ADGUC and that express ADGUC 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 ADGUC using either specific polyclonal or monoclonal antibodies are known in the art. Examples of such techniques include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on ADGUC 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 ADGUC include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding ADGUC, 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 ADGUC 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 ADGUC may be designed to contain signal sequences which direct secretion of ADGUC 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 sequences encoding ADGUC 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 ADGUC protein containing a heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of ADGUC 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 ADGUC encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that ADGUC 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 ADGUC 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, ^{35}S-methionine.

ADGUC of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to ADGUC. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for specific binding to ADGUC. 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 ADGUC, 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 ADGUC 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 ADGUC, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, Drosophila, or E. coli. Cells expressing ADGUC or cell membrane fractions which contain ADGUC are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either ADGUC 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 ADGUC, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of ADGUC 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.

ADGUC of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds

that modulate the activity of ADGUC. Such compounds may include agonists, antagonists, or partial or inverse agonists. In one embodiment, an assay is performed under conditions permissive for ADGUC activity, wherein ADGUC is combined with at least one test compound, and the activity of ADGUC in the presence of a test compound is compared with the activity of ADGUC in the absence of the test compound. A change in the activity of ADGUC in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of ADGUC. Alternatively, a test compound is combined with an in vitro or cell-free system comprising ADGUC under conditions suitable for ADGUC activity, and the assay is performed. In either of these assays, a test compound which modulates the activity of ADGUC 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 ADGUC 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 heterozygous or homozygous strains. Transgenic animals thus generated may be tested with potential therapeutic or toxic agents.

Polynucleotides encoding ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC, e.g., by secreting ADGUC 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 ADGUC and adenylyl and guanylyl cyclases. In addition, examples of tissues expressing ADGUC are uterine leiomyoma and brain tissues and also can be found in Table 6. Therefore, ADGUC appears to play a role in neurological, cardiovascular, vision, reproductive, and smooth muscle disorders, and bacterial infections. In the treatment of disorders associated with increased ADGUC expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of ADGUC. In the treatment of disorders associated with decreased ADGUC expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of ADGUC.

Therefore, in one embodiment, ADGUC 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 ADGUC. Examples of such disorders include, but are not limited to, a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other 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, 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; akathesia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, and Tourette's disorder; a cardiovascular disorder such as arteriovenous fistula, atherosclerosis, hypertension, vasculitis, Raynaud's disease, aneurysms, arterial dissections, varicose veins, thrombophlebitis and phlebothrombosis, vascular tumors, and complications of thrombolysis,

balloon angioplasty, vascular replacement, and coronary artery bypass graft surgery, congestive heart failure, ischemic heart disease, angina pectoris, myocardial infarction, hypertensive heart disease, degenerative valvular heart disease, calcific aortic valve stenosis, congenitally bicuspid aortic valve, mitral annular calcification, mitral valve prolapse, rheumatic fever and rheumatic heart disease, infective endocarditis, nonbacterial thrombotic endocarditis, endocarditis of systemic lupus erythematosus, carcinoid heart disease, cardiomyopathy, myocarditis, pericarditis, neoplastic heart disease, congenital heart disease, and complications of cardiac transplantation, congenital lung anomalies, atelectasis, pulmonary congestion and edema, pulmonary embolism, pulmonary hemorrhage, pulmonary infarction, pulmonary hypertension, vascular sclerosis, obstructive pulmonary disease, restrictive pulmonary disease, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, chronic bronchitis, bronchial asthma, bronchiectasis, bacterial pneumonia, viral and mycoplasmal pneumonia, lung abscess, pulmonary tuberculosis, diffuse interstitial diseases, pneumoconioses, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative interstitial pneumonitis, hypersensitivity pneumonitis, pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia, diffuse pulmonary hemorrhage syndromes, Goodpasture's syndromes, idiopathic pulmonary hemosiderosis, pulmonary involvement in collagen-vascular disorders, pulmonary alveolar proteinosis, lung tumors, inflammatory and noninflammatory pleural effusions, pneumothorax, pleural tumors, drug-induced lung disease, radiation-induced lung disease, and complications of lung transplantation; a vision disorder such as conjunctivitis, keratoconjunctivitis sicca, keratitis, episcleritis, iritis, posterior uveitis, glaucoma, amaurosis fugax, ischemic optic neuropathy, optic neuritis, Leber's hereditary optic neuropathy, toxic optic neuropathy, vitreous detachment, retinal detachment, cataract, macular degeneration, central serous chorioretinopathy, retinitis pigmentosa, melanoma of the choroid, retrobulbar tumor, and chiasmal tumor; a reproductive disorder such as disorders of prolactin production; infertility, including tubal disease, ovulatory defects, and endometriosis; disruptions of the estrous cycle, disruptions of the menstrual cycle, polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, endometrial and ovarian tumors, uterine fibroids, autoimmune disorders, ectopic pregnancies, and teratogenesis; cancer of the breast, fibrocystic breast disease, and galactorrhea; disruptions 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, and gynecomastia; a smooth muscle disorder such as any impairment or alteration in the normal action of smooth muscle including, but not limited to, angina, anaphylactic shock, arrhythmias, asthma, cardiovascular shock, Cushing's syndrome, hypertension, hypoglycemia, myocardial infarction, migraine, and pheochromocytoma, and myopathies including cardiomyopathy, encephalopathy, epilepsy, Kearns-Sayre syndrome, lactic acidosis, myoclonic disorder, and ophthalmoplegia; and an infection by a bacterial agent classified as

pneumococcus, staphylococcus, streptococcus, bacillus, corynebacterium, clostridium, meningococcus, gonococcus, listeria, moraxella, kingella, haemophilus, legionella, bordetella, gram-negative enterobacterium including shigella, salmonella, and campylobacter, pseudomonas, vibrio, brucella, francisella, yersinia, bartonella, norcardium, actinomyces, mycobacterium, spirochaetale, rickettsia, chlamydia, and mycoplasma.

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

In a further embodiment, a composition comprising a substantially purified ADGUC 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 ADGUC including, but not limited to, those provided above.

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

In a further embodiment, an antagonist of ADGUC may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of ADGUC. Examples of such disorders include, but are not limited to, those neurological, cardiovascular, vision, reproductive, and smooth muscle disorders, and bacterial infections described above. In one aspect, an antibody which specifically binds ADGUC 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 ADGUC.

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

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

An antagonist of ADGUC may be produced using methods which are generally known in the art. In particular, purified ADGUC may be used to produce antibodies or to screen libraries of pharmaceutical agents to identify those which specifically bind ADGUC. Antibodies to ADGUC may

also be generated using methods that are well known in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, and single chain antibodies, Fab fragments, and fragments produced by a Fab expression library. Neutralizing antibodies (i.e., those which inhibit dimer formation) are generally preferred for therapeutic use.

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

It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to ADGUC have an amino acid sequence consisting of at least about 5 amino acids, and generally will consist of at least about 10 amino acids. It is also preferable that these oligopeptides, peptides, or fragments are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein. Short stretches of ADGUC 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 ADGUC may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique. (See, e.g., Kohler, G. et al. (1975) Nature 256:495-497; Kozbor, D. et al. (1985) J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote, R.J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030; and Cole, S.P. et al. (1984) Mol. Cell Biol. 62:109-120.)

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

Antibodies may also be produced by inducing in vivo production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in

the literature. (See, e.g., Orlandi, R. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Winter, G. et al. (1991) Nature 349:293-299.)

Antibody fragments which contain specific binding sites for ADGUC 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 ADGUC and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two non-interfering ADGUC 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 ADGUC. Affinity is expressed as an association constant, K_a, which is defined as the molar concentration of ADGUC-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 ADGUC epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for ADGUC. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular ADGUC epitope, represents a true measure of affinity. High-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^9 to 10^{12} L/mole are preferred for use in immunoassays in which the ADGUC-antibody complex must withstand rigorous manipulations. Low-affinity antibody preparations with K_a ranging from about 10^6 to 10^7 L/mole are preferred for use in immunopurification and similar procedures which ultimately require dissociation of ADGUC, 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 ADGUC-antibody

complexes. Procedures for evaluating antibody specificity, titer, and avidity, and guidelines for antibody quality and usage in various applications, are generally available. (See, e.g., Catty, supra, and Coligan et al. supra.)

In another embodiment of the invention, the polynucleotides encoding ADGUC, 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 ADGUC. 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 ADGUC. (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 ADGUC 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), 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 ADGUC expression or regulation causes disease, the expression of ADGUC from an appropriate population of transduced cells may alleviate the clinical manifestations caused by the genetic deficiency.

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

Expression vectors that may be effective for the expression of ADGUC include, but are not 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). ADGUC may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV), SV40 virus, thymidine kinase (TK), or β-actin genes), (ii) an inducible promoter (e.g., the tetracycline-regulated promoter (Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456), commercially available in the T-REX plasmid (Invitrogen)); the ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, supra)), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding ADGUC from a normal individual.

Commercially available liposome transformation kits (e.g., the PERFECT LIPID TRANSFECTION KIT, available from Invitrogen) allow one with ordinary skill in the art to deliver polynucleotides to target cells in culture and require minimal effort to optimize experimental parameters. In the alternative, transformation is performed using the calcium phosphate method (Graham, F.L. and A.J. Eb (1973) Virology 52:456-467), or by electroporation (Neumann, E. et al.

(1982) EMBO J. 1:841-845). The introduction of DNA to primary cells requires modification of these standardized mammalian transfection protocols.

In another embodiment of the invention, diseases or disorders caused by genetic defects with respect to ADGUC expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding ADGUC under the control of an independent promoter or the retrovirus long terminal repeat (LTR) promoter, (ii) appropriate RNA packaging signals, and (iii) a Rev-responsive element (RRE) along with additional retrovirus *cis*-acting RNA sequences and coding sequences required for efficient vector propagation. Retrovirus vectors (e.g., PFB and PFBNEO) are commercially available (Stratagene) and are based on published data (Riviere, I. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6733-6737), incorporated by reference herein. The vector is propagated in an appropriate vector producing cell line (VPCL) that expresses an envelope gene with a tropism for receptors on the target cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent 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 ADGUC to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of ADGUC. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Csete, M.E. et al. (1995) Transplantation 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent No. 5,707,618 to Armentano ("Adenovirus vectors for gene therapy"), hereby incorporated by reference. For adenoviral vectors, see also Antinozzi, 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 ADGUC to target cells which have one or more genetic abnormalities with

respect to the expression of ADGUC. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing ADGUC to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent 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 ADGUC 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 ADGUC into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of ADGUC-coding RNAs and the synthesis of high levels of ADGUC 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 ADGUC 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 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 ADGUC.

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 ADGUC. 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 compound which is effective in altering expression of a polynucleotide encoding ADGUC. Compounds which may be effective in altering expression of a specific polynucleotide may include, but are not limited to, oligonucleotides, antisense oligomucleotides, triple helix-forming oligomucleotides, 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 ADGUC expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding ADGUC may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased ADGUC expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC. 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 (Bruice, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruice, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and equally suitable for use in vivo, in vitro, and ex vivo. For ex vivo therapy, vectors may be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection, by liposome injections, or by polycationic amino polymers may be achieved using methods which are well known in the art. (See, e.g., Goldman, C.K. et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15:462-466.)

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

An additional embodiment of the invention relates to the administration of a composition which generally comprises an active ingredient formulated with a pharmaceutically acceptable excipient. Excipients may include, for example, sugars, starches, celluloses, gums, and proteins. Various formulations are commonly known and are thoroughly discussed in the latest edition of Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing, Easton PA). Such compositions may consist of ADGUC, antibodies to ADGUC, and mimetics, agonists, antagonists, or inhibitors of ADGUC.

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.

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

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

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example ADGUC or fragments thereof, antibodies of ADGUC, and agonists, antagonists or inhibitors of ADGUC, 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. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, the sensitivity of the patient, and the route of administration.

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

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

DIAGNOSTICS

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

In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding ADGUC or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode ADGUC. 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 ADGUC, 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 ADGUC encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:3-4 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the ADGUC gene.

Means for producing specific hybridization probes for DNAs encoding ADGUC include the cloning of polynucleotide sequences encoding ADGUC or ADGUC 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 ^{32}P or ^{35}S, or by enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

Polynucleotide sequences encoding ADGUC may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of ADGUC. Examples of such disorders include, but are not limited to, a neurological disorder such as epilepsy, ischemic cerebrovascular disease, stroke, cerebral neoplasms, Alzheimer's disease, Pick's disease, Huntington's disease, dementia, Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders, amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders, progressive neural muscular atrophy, retinitis pigmentosa, hereditary ataxias, multiple sclerosis and other 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, 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; akathesia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, and Tourette's disorder; a cardiovascular disorder such as arteriovenous fistula, atherosclerosis, hypertension, vasculitis, Raynaud's disease,

aneurysms, arterial dissections, varicose veins, thrombophlebitis and phlebothrombosis, vascular tumors, and complications of thrombolysis, balloon angioplasty, vascular replacement, and coronary artery bypass graft surgery, congestive heart failure, ischemic heart disease, angina pectoris, myocardial infarction, hypertensive heart disease, degenerative valvular heart disease, calcific aortic valve stenosis, congenitally bicuspid aortic valve, mitral annular calcification, mitral valve prolapse, rheumatic fever and rheumatic heart disease, infective endocarditis, nonbacterial thrombotic endocarditis, endocarditis of systemic lupus erythematosus, carcinoid heart disease, cardiomyopathy, myocarditis, pericarditis, neoplastic heart disease, congenital heart disease, and complications of cardiac transplantation, congenital lung anomalies, atelectasis, pulmonary congestion and edema, pulmonary embolism, pulmonary hemorrhage, pulmonary infarction, pulmonary hypertension, vascular sclerosis, obstructive pulmonary disease, restrictive pulmonary disease, chronic obstructive pulmonary disease, emphysema, chronic bronchitis, bronchial asthma, bronchiectasis, bacterial pneumonia, viral and mycoplasmal pneumonia, lung abscess, pulmonary tuberculosis, diffuse interstitial diseases, pneumoconioses, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative interstitial pneumonitis, hypersensitivity pneumonitis, pulmonary eosinophilia bronchiolitis obliterans-organizing pneumonia, diffuse pulmonary hemorrhage syndromes, Goodpasture's syndromes, idiopathic pulmonary hemosiderosis, pulmonary involvement in collagen-vascular disorders, pulmonary alveolar proteinosis, lung tumors, inflammatory and noninflammatory pleural effusions, pneumothorax, pleural tumors, drug-induced lung disease, radiation-induced lung disease, and complications of lung transplantation; a vision disorder such as conjunctivitis, keratoconjunctivitis sicca, keratitis, episcleritis, iritis, posterior uveitis, glaucoma, amaurosis fugax, ischemic optic neuropathy, optic neuritis, Leber's hereditary optic neuropathy, toxic optic neuropathy, vitreous detachment, retinal detachment, cataract, macular degeneration, central serous chorioretinopathy, retinitis pigmentosa, melanoma of the choroid, retrobulbar tumor, and chiasmal tumor; a reproductive disorder such as disorders of prolactin production; infertility, including tubal disease, ovulatory defects, and endometriosis; disruptions of the estrous cycle, disruptions of the menstrual cycle, polycystic ovary syndrome, ovarian hyperstimulation syndrome, endometrial and ovarian tumors, uterine fibroids, autoimmune disorders, ectopic pregnancies, and teratogenesis; cancer of the breast, fibrocystic breast disease, and galactorrhea; disruptions 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, and gynecomastia; a smooth muscle disorder such as any impairment or alteration in the normal action of smooth muscle including, but not limited to, angina, anaphylactic shock, arrhythmias, asthma, cardiovascular shock, Cushing's syndrome, hypertension, hypoglycemia, myocardial infarction, migraine, and pheochromocytoma, and myopathies including cardiomyopathy, encephalopathy,

epilepsy, Kearns-Sayre syndrome, lactic acidosis, myoclonic disorder, and ophthalmoplegia; and an infection by a bacterial agent classified as pneumococcus, staphylococcus, streptococcus, bacillus, corynebacterium, clostridium, meningococcus, gonococcus, listeria, moraxella, kingella, haemophilus, legionella, bordetella, gram-negative enterobacterium including shigella, salmonella, and campylobacter, pseudomonas, vibrio, brucella, francisella, yersinia, bartonella, norcardium, actinomyces, mycobacterium, spirochaetale, rickettsia, chlamydia, and mycoplasma. The polynucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequences encoding ADGUC may be useful in assays that detect the presence of associated disorders, particularly those mentioned above. The nucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC in the sample indicates the presence of the associated disorder. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or to monitor the treatment of an individual patient.

In order to provide a basis for the diagnosis of a disorder associated with expression of ADGUC, 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 ADGUC, 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 ADGUC 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 ADGUC, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding ADGUC, 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 ADGUC may be used to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs). SNPs are substitutions, insertions and deletions that are a frequent cause of inherited or acquired genetic disease in humans. Methods of SNP detection include, but are not limited to, single-stranded conformation polymorphism (SSCP) and fluorescent SSCP (fSSCP) methods. In SSCP, oligonucleotide primers derived from the polynucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC 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, ADGUC, fragments of ADGUC, or antibodies specific for ADGUC may be used as elements on a microarray. The microarray may be used to monitor or measure protein-protein interactions, drug-target interactions, and gene expression profiles, as described above.

A particular embodiment relates to the use of the polynucleotides of the present invention to generate a transcript image of a tissue or cell type. A transcript image represents the global pattern of gene expression by a particular tissue or cell type. Global gene expression patterns are analyzed by quantifying the number of expressed genes and their relative abundance under given conditions and at a given time. (See Seilhamer et al., "Comparative Gene Transcript Analysis," U.S. Patent 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.

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

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

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

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

Fluorescent in situ hybridization (FISH) may be correlated with other physical and genetic map data. (See, e.g., Heinz-Ulrich, et al. (1995) in Meyers, supra, pp. 965-968.) Examples of genetic map data can be found in various scientific journals or at the Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) World Wide Web site. Correlation between the location of the gene encoding ADGUC 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, ADGUC, 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 ADGUC and the agent being tested may be measured.

Another technique for drug screening provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest. (See, e.g., Geysen, et al. (1984) PCT application WO84/03564.) In this method, large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid substrate. The test compounds are reacted with ADGUC, or fragments thereof, and washed. Bound ADGUC is then detected by methods well known in the art. Purified ADGUC 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 ADGUC specifically compete with a test compound for binding ADGUC. In this manner, antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with ADGUC.

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode ADGUC 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. 60/257,193 and U.S. Ser. No. 60/260,111, are hereby expressly incorporated by reference.

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

Incyte cDNAs were derived from cDNA libraries described in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA). 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 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 SUPERSCRIPT plasmid system (Life Technologies), using the recommended procedures or similar methods known in the art. (See, e.g., Ausubel, 1997, supra, units 5.1-6.6.) Reverse transcription was initiated using oligo d(T) or random primers. Synthetic oligonucleotide adapters were ligated to double stranded cDNA, and the cDNA was digested with the appropriate restriction enzyme or enzymes. For most libraries, the cDNA was size-selected (300-1000 bp) using SEPHACRYL S1000, SEPHAROSE CL2B, or SEPHAROSE CL4B column chromatography (Amersham Pharmacia Biotech) or preparative agarose gel electrophoresis. cDNAs were ligated into compatible restriction enzyme sites of the polylinker of a suitable plasmid, e.g., PBLUESCRIPT plasmid (Stratagene), PSPORT1 plasmid (Life Technologies), PCDNA2.1 plasmid (Invitrogen, Carlsbad CA), PBK-CMV plasmid (Stratagene), PCR2-TOPOTA plasmid (Invitrogen),

PCMV-ICIS plasmid (Stratagene), pIGEN (Incyte Genomics, Palo Alto CA), pRARE (Incyte Genomics), 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 DH5α, DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

II. Isolation of cDNA Clones

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

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

III. Sequencing and Analysis

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

The polynucleotide sequences derived from Incyte cDNAs were validated by removing

vector, linker, and poly(A) sequences and by masking ambiguous bases, using algorithms and programs based on BLAST, dynamic programming, and dinucleotide nearest neighbor analysis. The Incyte cDNA 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; PROTEOME databases with sequences from Homo sapiens, Rattus norvegicus, Mus musculus, Caenorhabditis elegans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, and Candida albicans (Incyte Genomics, Palo Alto CA); and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic approach which analyzes consensus primary structures of gene families. See, for example, Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA sequences were assembled to produce full length polynucleotide sequences. Alternatively, GenBank cDNAs, GenBank ESTs, stitched sequences, stretched sequences, or Genscan-predicted coding sequences (see Examples IV and V) were used to extend Incyte cDNA assemblages to full length. Assembly was performed using programs based on Phred, Phrap, and Consed, and cDNA assemblages were screened for open reading frames using programs based on GeneMark, BLAST, and FASTA. The full length polynucleotide sequences were translated to derive the corresponding full length polypeptide sequences. Alternatively, a polypeptide of the invention may begin at any of the methionine residues of the full length translated polypeptide. Full length polypeptide sequences were subsequently analyzed by querying against databases such as the GenBank protein databases (genpept), SwissProt, the PROTEOME databases, 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 CLUSTAL algorithm as incorporated into the MEGALIGN multisequence alignment program (DNASTAR), which also calculates the percent identity between aligned sequences.

Table 7 summarizes the tools, programs, and algorithms used for the analysis and assembly of Incyte cDNA and full length sequences and provides applicable descriptions, references, and threshold 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 2.

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

Putative adenylyl and guanylyl cyclases were initially identified by running the Genscan gene identification program against public genomic sequence databases (e.g., gbpri and gbhtg). Genscan is a general-purpose gene identification program which analyzes genomic DNA sequences from a variety of organisms (See Burge, C. and S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268:78-94, and Burge, C. and S. Karlin (1998) Curr. Opin. Struct. Biol. 8:346-354). The program concatenates predicted exons to form an assembled cDNA sequence extending from a methionine to a stop codon. The output of Genscan is a FASTA database of polynucleotide and polypeptide sequences. The maximum range of sequence for Genscan to analyze at once was set to 30 kb. To determine which of these Genscan predicted cDNA sequences encode adenylyl and guanylyl cyclases, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for adenylyl and guanylyl cyclases. Potential adenylyl and guanylyl cyclases were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as adenylyl and guanylyl cyclases. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbpri public databases. Where necessary, the Genscan-predicted sequences were then edited by comparison to the top BLAST hit from genpept to correct errors in the sequence predicted by Genscan, such as extra or omitted exons. BLAST analysis was also used to find any Incyte cDNA or public cDNA coverage of the Genscan-predicted sequences, thus providing evidence for transcription. When Incyte cDNA coverage was available, this information was used to correct or confirm the Genscan predicted sequence. Full length polynucleotide sequences were obtained by assembling Genscan-predicted coding sequences with Incyte cDNA sequences and/or public cDNA sequences using the assembly process described in Example III. Alternatively, full length polynucleotide sequences were derived entirely from edited or unedited Genscan-predicted coding sequences.

V. Assembly of Genomic Sequence Data with cDNA Sequence Data

"Stitched" Sequences

Partial cDNA sequences were extended with exons predicted by the Genscan gene identification program described in Example IV. Partial cDNAs assembled as described in Example III were mapped to genomic DNA and parsed into clusters containing related cDNAs and Genscan exon predictions from one or more genomic sequences. Each cluster was analyzed using an algorithm

based on graph theory and dynamic programming to integrate cDNA and genomic information, generating possible splice variants that were subsequently confirmed, edited, or extended to create a full length sequence. Sequence intervals in which the entire length of the interval was present on more than one sequence in the cluster were identified, and intervals thus identified were considered to be equivalent by transitivity. For example, if an interval was present on a cDNA and two genomic sequences, then all three intervals were considered to be equivalent. This process allows unrelated but consecutive genomic sequences to be brought together, bridged by cDNA sequence. Intervals thus identified were then "stitched" together by the stitching algorithm in the order that they appear along their parent sequences to generate the longest possible sequence, as well as sequence variants. Linkages between intervals which proceed along one type of parent sequence (cDNA to cDNA or genomic sequence to genomic sequence) were given preference over linkages which change parent type (cDNA to genomic sequence). The resultant stitched sequences were translated and compared by BLAST analysis to the genpept and 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 analysis. First, partial cDNAs assembled as described in Example III were queried against public databases such as the GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases using the BLAST program. The nearest GenBank protein homolog was then compared by BLAST analysis to either Incyte cDNA sequences or GenScan exon predicted sequences described in Example IV. A chimeric protein was generated by using the resultant high-scoring segment pairs (HSPs) to map the translated sequences onto the GenBank protein homolog. Insertions or deletions may occur in the chimeric protein with respect to the original GenBank protein homolog. The GenBank protein homolog, the chimeric protein, or both were used as probes to search for homologous genomic sequences from the public human genome databases. Partial DNA sequences were therefore "stretched" or extended by the addition of homologous genomic sequences. The resultant stretched sequences were examined to determine whether it contained a complete gene.

VI. Chromosomal Mapping of ADGUC 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:

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

The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. The product score is a normalized value between 0 and 100, and is calculated as follows: the BLAST score is multiplied by the percent nucleotide identity and the product is divided by (5 times the length of the shorter of the two sequences). The BLAST score is calculated by assigning a score of +5 for every base that matches in a high-scoring segment pair (HSP), and -4 for every mismatch. Two sequences may share more than one HSP (separated by

gaps). If there is more than one HSP, then the pair with the highest BLAST score is used to calculate the product score. The product score represents a balance between fractional overlap and quality in a BLAST alignment. For example, a product score of 100 is produced only for 100% identity over the entire length of the shorter of the two sequences being compared. A product score of 70 is produced either by 100% identity and 70% overlap at one end, or by 88% identity and 100% overlap at the other. A product score of 50 is produced either by 100% identity and 50% overlap at one end, or 79% identity and 100% overlap.

Alternatively, polynucleotide sequences encoding ADGUC 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 ADGUC. cDNA sequences and cDNA library/tissue information are found in the LIFESEQ GOLD database (Incyte Genomics, Palo Alto CA).

VIII. Extension of ADGUC 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 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 µl PICOGREEN quantitation reagent (0.25% (v/v) PICOGREEN; Molecular Probes, Eugene OR) dissolved in 1X TE and 0.5 µl of undiluted PCR product into each well of an opaque fluorimeter plate (Corning Costar, Acton MA), allowing the DNA to bind to the reagent. The plate was scanned in a Fluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 µl to 10 µl aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose gel to determine which reactions were successful in extending the sequence.

The extended nucleotides were desalted and concentrated, transferred to 384-well plates, digested with CviJI cholera virus endonuclease (Molecular Biology Research, Madison WI), and sonicated or sheared prior to religation into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For 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 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% dimethysulfoxide (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 μCi 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 (Schena (1999), supra). Suggested substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding procedures. A typical array may be produced using available methods and machines well known to those of ordinary skill in the art and may contain any appropriate number of elements. (See, e.g., 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 comprise the elements of the microarray. Fragments or oligomers suitable for hybridization can be selected using software well known in the art such as LASERGENE software (DNASTAR). The array elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection. After hybridization, nonhybridized nucleotides from the biological sample are removed, and a fluorescence scanner is used to detect hybridization at each array element. Alternatively, laser desorbtion and mass spectrometry may be used for detection of hybridization. The degree of complementarity and the relative abundance of each polynucleotide which hybridizes to an element on the microarray may be assessed. In one embodiment, microarray preparation and usage is described in detail below.

Tissue or Cell Sample Preparation

Total RNA is isolated from tissue samples using the guanidinium thiocyanate method and poly(A)$^+$ RNA is purified using the oligo-(dT) cellulose method. Each poly(A)$^+$ RNA sample is reverse transcribed using MMLV reverse-transcriptase, 0.05 pg/μl oligo-(dT) primer (21mer), 1X first strand buffer, 0.03 units/μl RNase inhibitor, 500 μM dATP, 500 μM dGTP, 500 μM dTTP, 40 μM dCTP, 40 μM dCTP-Cy3 (BDS) or dCTP-Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech). The reverse transcription reaction is performed in a 25 ml volume containing 200 ng poly(A)$^+$ RNA with GEMBRIGHT kits (Incyte). Specific control poly(A)$^+$ RNAs are synthesized by in vitro transcription from non-coding yeast genomic DNA. After incubation at 37°C for 2 hr, each reaction sample (one with Cy3 and another with Cy5 labeling) is treated with 2.5 ml of 0.5M sodium hydroxide and incubated for 20 minutes at 85°C to the stop the reaction and degrade the RNA. Samples are purified using two successive CHROMA SPIN 30 gel filtration spin columns (CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA) and after combining, both reaction samples are ethanol precipitated using 1 ml of glycogen (1 mg/ml), 60 ml sodium acetate, and 300 ml of 100% ethanol. The sample is then dried to completion using a SpeedVAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY) and resuspended in 14 μl 5X SSC/0.2% SDS.

Microarray Preparation

Sequences of the present invention are used to generate array elements. Each array element is amplified from bacterial cells containing vectors with cloned cDNA inserts. PCR amplification uses primers complementary to the vector sequences flanking the cDNA insert. Array elements are amplified in thirty cycles of PCR from an initial quantity of 1-2 ng to a final quantity greater than 5 μg. Amplified array elements are then purified using SEPHACRYL-400 (Amersham Pharmacia Biotech).

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

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 cm^2 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.

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

XII. Expression of ADGUC

Expression and purification of ADGUC is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of ADGUC in bacteria, cDNA is subcloned into an appropriate vector containing an antibiotic resistance gene and an inducible promoter that directs high levels of cDNA transcription. Examples of such promoters include, but are not limited to, the *trp-lac* (*tac*) hybrid promoter and the T5 or T7 bacteriophage promoter in conjunction with the *lac* operator regulatory element. Recombinant vectors are transformed into suitable bacterial hosts, e.g., BL21(DE3). Antibiotic resistant bacteria express ADGUC upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of ADGUC 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 ADGUC by either homologous recombination or bacterial-mediated transposition involving transfer plasmid intermediates. Viral infectivity is maintained and the strong polyhedrin promoter drives high levels of cDNA transcription. Recombinant baculovirus is used to infect Spodoptera frugiperda (Sf9) insect cells in most cases, or human hepatocytes, in some cases. Infection of the latter requires additional genetic modifications to baculovirus. (See Engelhard, E.K. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

In most expression systems, ADGUC 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 ADGUC 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 ADGUC obtained by these methods can be used directly in the assays shown in Examples XVI, XVII, and XVIII, etc. where applicable.

XIII. Functional Assays

ADGUC function is assessed by expressing the sequences encoding ADGUC at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen,

Carlsbad CA), both of which contain the cytomegalovirus promoter. 5-10 μg 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 μg 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 ADGUC on gene expression can be assessed using highly purified populations of cells transfected with sequences encoding ADGUC 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 ADGUC and other genes of interest can be analyzed by northern analysis or microarray techniques.

XIV. Production of ADGUC Specific Antibodies

ADGUC 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 ADGUC amino acid sequence is analyzed using LASERGENE software (DNASTAR) to determine regions of high immunogenicity, and a corresponding oligopeptide is synthesized and used to raise antibodies by means known to those of skill in the art. Methods for selection of appropriate epitopes, such as those near the C-terminus or in hydrophilic regions are well described in the art. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra, ch. 11.)

Typically, oligopeptides of about 15 residues in length are synthesized using an ABI 431A peptide synthesizer (Applied Biosystems) using FMOC chemistry and coupled to KLH (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) by reaction with N-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) to increase immunogenicity. (See, e.g., Ausubel, 1995, supra.) Rabbits are immunized with the oligopeptide-KLH complex in complete Freund's adjuvant. Resulting antisera are tested for antipeptide and anti-ADGUC activity by, for example, binding the peptide or ADGUC to a substrate, blocking with 1% BSA, reacting with rabbit antisera, washing, and reacting with radio-iodinated goat anti-rabbit IgG.

XV. Purification of Naturally Occurring ADGUC Using Specific Antibodies

Naturally occurring or recombinant ADGUC is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for ADGUC. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-ADGUC 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 ADGUC are passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of ADGUC (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/ADGUC 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 ADGUC is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with ADGUC

ADGUC, or biologically active fragments thereof, are labeled with ^{125}I 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 ADGUC, washed, and any wells with labeled ADGUC complex are assayed. Data obtained using different concentrations of ADGUC are used to calculate values for the number, affinity, and association of ADGUC with the candidate molecules.

Alternatively, molecules interacting with ADGUC 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).

ADGUC 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 ADGUC Activity

Adenylyl cylcase activity of ADGUC is demonstrated by the ability to convert ATP to cAMP (Mittal, C.K. (1986) Meth. Enzymol. 132:422-428). In this assay ADGUC is incubated with the substrate [α-^{32}P]ATP, following which the excess substrate is separated from the product cyclic [^{32}P] AMP. ADGUC activity is determined in 12 x 75 mm disposable culture tubes containing 5 μl of 0.6 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 μl of 0.2 M $MgCl_2$, 5 μl of 150 mM creatine phosphate containing 3 units of creatine phosphokinase, 5 μl of 4.0 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, 5 μl of 20 mM cAMP, 5 μl 20 mM dithiothreitol, 5 μl of 10 mM ATP, 10 μl [α-^{32}P]ATP (2-4 x 10^6 cpm), and water in a total volume of 100 μl. The reaction mixture is prewarmed to 30°C. The reaction is initiated by adding ADGUC to the prewarmed reaction mixture. After 10-15 minutes of incubation at 30°C, the reaction is terminated by adding 25 μl of 30% ice-cold trichloroacetic acid (TCA). Zero-time incubations and reactions incubated in the absence of ADGUC are used as negative controls. Products are separated by ion exchange chromatography, and cyclic [^{32}P] AMP is quantified using a β-radioisotope counter. The ADGUC activity is proportional to the amount of cyclic [^{32}P] AMP formed in the reaction.

Guanylyl cylcase activity of ADGUC is demonstrated by the ability to convert GTP to cGMP (Mittal, supra). In this assay ADGUC is incubated with the substrate [α-^{32}P]GTP, following which the excess substrate is separated from the product cyclic [^{32}P] GMP. A reaction mixture contains 5 μl of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 μl 80 mM $MnCl_2$ or $MgCl_2$, 25 μl of 40 mM theophylline or 2.0 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, 5 μl 150 mM creatine phosphate containing 20 μg creatine phosphokinase (120-135 units/mg protein), 5 μl 20 mM cGMP, 10 μl 10 mM GTP, 10 μl [α-^{32}P] GTP (containing 2-4 x 10^6 cpm), and water in a total volume of 100 μl. The reaction is initiated by the addition of ADGUC. After 10-15 minutes of incubation at 37°C, the reaction is terminated by adding 20 μl of 40% ice-cold trichloroacetic acid. Zero-time incubations and reactions incubated in the absence of ADGUC are used as negative controls. Products are separated by ion exchange chromatography, and cyclic [^{32}P] GMP is quantified using a β-radioisotope counter. The ADGUC activity is proportional to the amount of cyclic [^{32}P] GMP formed in the reaction.

XVIII. Identification of ADGUC Agonists and Antagonists

Agonists or antagonists of ADGUC activation or inhibition may be tested using the assays described in section XVII, or with the use of assay technologies which allow high throughput readout in multi-well plate format, such as the Cyclic AMP FlashPlate Assay and Cyclic GMP FlashPlate Assay (NEN Life Sciences Products). Agonists cause an increase in ADGUC activity and antagonists cause a decrease in ADGUC activity.

Various modifications and variations of the described methods and systems of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with certain embodiments, it should be

understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in molecular biology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

Table 1

Incyte Project ID	Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID
5678457	1	5678457CD1	3	5678457CB1
7474459	2	7474459CD1	4	7474459CB1

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO:	Probability Score	GenBank Homolog
1	5678557CD1	g868201	1.7e-47	Similar to adenylate cyclase [Caenorhabditis elegans]
2	7474459CD1	g1504042	2.5e-126	Similar to yeast adenylate cyclase (S56776) [Homo sapiens]. Nagase, T. et al. (1996) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. DNA Res. 3:321-329.

Table 3

SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
1	5676557CD1	239	S129 S145 S149 S169 T234 Y224		Leucine rich repeat: N39-C62, K86-S108, L63-K85, A109-R131, R177-Q202, Q154-P176, H132-G151	HMMER-PFAM
					Leucine-rich repeat signature PR00019: L40-L53, I84-L97	BLIMPS-PRINTS
					Yeast adenylate cyclase catalytic domain: DM02017|Q09564|466-564: L64-E157 (P-value = 6.6e-07)	BLAST-DOMO
2	7474459CD1	814	Y117, S161, S162, T180, T198, T239, S361, S364, S396, T450, S455, S459, S548, S559, S570, S595, S637, T652, Y677, S766	N81, N320	Signal cleavage: M1-G60	SPSCAN
					Leucine-rich repeat: S672-S694, G695-Q717, W718-R740, K741-R763, K649-R671, A624-Q645, A764-G786, A601-G623	HMMER-PFAM
					Transmembrane domain: W42-Q64, A128-K156, M272-F300, H325-Y350; N-terminus is not cytoplasmic	TMAP
					Leucine-rich repeat signature: PR00019: L673-L686	BLIMPS-PRINTS

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO:/ Incyte ID/ Sequence Length	Sequence Fragments
3/5678557CB1/1420	1-237, 1-660, 3-237, 4-478, 4-509, 5-237, 6-237, 6-336, 15-645, 15-679, 16-264, 16-359, 16-379, 16-390, 16-489, 16-515, 16-569, 16-574, 16-608, 16-610, 16-618, 16-650, 16-659, 16-673, 16-701, 18-514, 18-631, 18-647, 21-256, 22-237, 22-269, 22-359, 22-437, 22-680, 23-237, 23-252, 24-237, 30-321, 30-586, 43-769, 48-197, 48-237, 50-741, 73-237, 75-780, 91-237, 96-235, 113-237, 209-477, 209-852, 403-1075, 449-1050, 461-1336, 483-1190, 487-665, 487-1020, 495-1087, 512-1089, 521-1256, 552-740, 562-1230, 564-1304, 586-1258, 587-1262, 604-734, 609-1243, 635-1132, 658-1247, 672-1306, 733-1271, 745-1404, 769-1061, 777-1309, 783-1420, 792-1251, 799-1420, 829-1240, 918-1352, 921-1412, 926-1420, 1034-1282, 1129-1289
4/7474459CB1/3278	1-2445, 49-586, 106-686, 106-766, 193-561, 472-1124, 590-1124, 701-1346, 1123-1781, 1211-1924, 1320-2129, 1702-2364, 1715-1939, 2015-2592, 2063-2692, 2064-2561, 2140-2823, 2425-2683, 2425-3256, 2544-3202, 2637-3019, 2671-3278, 2695-3172, 2704-3136, 2763-3044, 2855-3186, 2894-3158, 2956-3246

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Project ID	Representative Library
3	5678557CB1	PLACFEE06
4	7474459CB1	UTRCD1201

Table 6

Library	Vector	Library Description
PLACFER06	pINCY	This random primed library was constructed using RNA isolated from placental tissue removed from a Caucasian fetus who died after 16 weeks' gestation from fetal demise and hydrocephalus. Patient history included umbilical cord wrapped around the head (3 times) and the shoulders (1 time). Serology was positive for anti-CMV. Family history included multiple pregnancies and live births, and an abortion.
UTRCDIS01	PCDNA2.1	This 5' biased random primed library was constructed using RNA isolated from uterine cervix tissue removed from a 29-year-old Caucasian female during a vaginal hysterectomy and cystocele repair. Pathology indicated the cervix showed mild chronic cervicitis with focal squamous metaplasia. Pathology for the matched tumor tissue indicated intramural uterine leiomyoma. Patient history included hypothyroidism, pelvic floor relaxation, paraplegia, and self catheterization. Previous surgeries included a normal delivery, a laminectomy, and a rhinoplasty. Patient medications included Synthroid. Family history included benign hypertension in the father; and type II diabetes and hyperlipidemia in the mother.

Table 7

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ABI FACTURA	A program that removes vector sequences and masks ambiguous bases in nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PARACEL FDF	A Fast Data Finder useful in comparing and annotating amino acid or nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA; Paracel Inc., Pasadena, CA.	Mismatch <50%
ABI AutoAssembler	A program that assembles nucleic acid sequences.	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	A Basic Local Alignment Search Tool useful in sequence similarity search for amino acid and nucleic acid sequences. BLAST includes five functions: blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx.	Altschul, S.F. et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	*ESTs*: Probability value= 1.0E-8 or less *Full Length sequences*: Probability value= 1.0E-10 or less
FASTA	A Pearson and Lipman algorithm that searches for similarity between a query sequence and a group of sequences of the same type. FASTA comprises as least five functions: fasta, tfasta, fastx, tfastx, and ssearch.	Pearson, W.R. and D.J. Lipman (1988) Proc. Natl Acad Sci. USA 85:2444-2448; Pearson, W.R. (1990) Methods Enzymol. 183:63-98; and Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489.	*ESTs*: fasta E value=1.06E-6 *Assembled ESTs*: fasta identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fastx E value=1.0E-8 or less *Full Length sequences*: fastx score=100 or greater
BLIMPS	A BLocks IMProved Searcher that matches a sequence against those in BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and PFAM databases to search for gene families, sequence homology, and structural fingerprint regions.	Henikoff, S. and J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res. 19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1996) Methods Enzymol. 266:88-105; and Attwood, T.K. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
HMMER	An algorithm for searching a query sequence against hidden Markov model (HMM)-based databases of protein family consensus sequences, such as PFAM.	Krogh, A. et al. (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. et al. (1988) Nucleic Acids Res. 26:320-322; Durbin, R. et al. (1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	*PFAM hits*: Probability value= 1.0E-3 or less *Signal peptide hits*: Score= 0 or greater

Table 7 (cont.)

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ProfileScan	An algorithm that searches for structural and sequence motifs in protein sequences that match sequence patterns defined in Prosite.	Gribskov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality score; GCG-specified "HIGH" value for that particular Prosite motif. Generally, score=1.4-2.1.
Pfred	A base-calling algorithm that examines automated sequencer traces with high sensitivity and probability.	Ewing, B. et al. (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	A Phils Revised Assembly Program including SWAT and CrossMatch, programs based on efficient implementation of the Smith-Waterman algorithm, useful in searching sequence homology and assembling DNA sequences.	Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman, (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	Score= 120 or greater; Match length= 56 or greater
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.	Bairoch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, version 9, page M51-59, Genetics Computer Group, Madison, WI.	

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

b) recovering the polypeptide so expressed.

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

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

12. 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 a polynucleotide of a),

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.

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:

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.

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:

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.

17. A composition comprising a polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable excipient.

18. A composition of claim 17, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2.

19. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional ADGUC, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 17.

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.

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 ADGUC, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition 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

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.

25. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional ADGUC, 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:

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.

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 compound, and

c) comparing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound with the activity of the polypeptide of claim 1 in the absence of the test compound, wherein a change in the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound is indicative of a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1.

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:

a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,

b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and

c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

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 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 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.

30. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of ADGUC in a biological sample, the method comprising:

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.

31. The antibody of claim 11, wherein the antibody is:

a) a chimeric antibody,

b) a single chain antibody,

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.

33. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of ADGUC in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 32.

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 ADGUC in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 34.

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 consisting of 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 comprising 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 consisting of 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 comprising 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 immunoglobulin library.

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

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-2 in the sample.

45. A method of purifying a polypeptide comprising 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

b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide comprising 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 13.

47. A method of generating an expression profile of a sample which contains polynucleotides, the method comprising:

a) labeling the polynucleotides of the sample,

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.

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.

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
BAUGHN, Mariah R.
TRIBOULEY, Catherine M.
WALIA, Narinder K.
LU, Yan

<120> ADENYLYL AND GUANYLYL CYLCLASES

<130> PI-0331 PCT

<140> To Be Assigned
<141> Herewith

<150> 60/257,193; 60/260,111
<151> 2000-12-19; 2001-01-05

<160> 4
<170> PERL Program

<210> 1
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5678557CD1

<400> 1

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

```
                200                 205                 210
Asn Leu Phe Glu Ile Lys Lys Leu Arg Glu Leu Glu Gly Tyr Asp
                215                 220                 225
Lys Tyr Met Glu Arg Phe Thr Ala Thr Lys Lys Lys Phe Ala
                230                 235

<210> 2
<211> 814
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7474459CD1

<400> 2
Met Gly Phe His His Val Gly Gln Ala Gly Leu Glu Leu Leu Thr
  1               5                  10                  15
Ser Gly Ser Met Ile Pro Val Ala Glu Phe Lys Gln Phe Thr Glu
                20                  25                  30
Gln Gln Pro Ala Phe Lys Val Leu Lys Pro Trp Trp Asp Val Leu
                35                  40                  45
Ala Glu Tyr Leu Thr Val Ala Met Leu Met Ile Gly Val Phe Gly
                50                  55                  60
Cys Thr Leu Gln Val Thr Gln Asp Lys Ile Ile Cys Leu Pro Asn
                65                  70                  75
His Glu Leu Gln Glu Asn Leu Ser Glu Ala Pro Cys Gln Gln Leu
                80                  85                  90
Leu Pro Arg Gly Ile Pro Glu Gln Ile Gly Ala Leu Gln Glu Val
                95                 100                 105
Lys Gly Leu Lys Asn Asn Leu Asp Leu Gln Gln Tyr Ser Phe Ile
               110                 115                 120
Asn Gln Leu Cys Tyr Glu Thr Ala Leu His Trp Tyr Ala Lys Tyr
               125                 130                 135
Phe Pro Tyr Leu Val Val Ile His Thr Leu Ile Phe Met Val Cys
               140                 145                 150
Thr Ser Phe Trp Phe Lys Phe Pro Gly Thr Ser Ser Lys Ile Glu
               155                 160                 165
His Phe Ile Ser Ile Leu Gly Lys Cys Phe Asp Ser Pro Trp Thr
               170                 175                 180
Thr Arg Ala Leu Ser Glu Val Ser Gly Glu Asn Gln Lys Gly Pro
               185                 190                 195
Ala Ala Thr Glu Arg Ala Ala Ala Thr Ile Val Ala Met Ala Gly
               200                 205                 210
Thr Gly Pro Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Lys Glu Lys Val Leu
               215                 220                 225
Ala Glu Pro Glu Lys Val Val Thr Glu Pro Pro Val Val Thr Leu
               230                 235                 240
Leu Asp Lys Lys Glu Gly Glu Gln Ala Lys Ala Leu Phe Glu Lys
               245                 250                 255
Val Lys Lys Phe Arg Met His Val Glu Glu Gly Asp Ile Leu Tyr
               260                 265                 270
Thr Met Tyr Ile Arg Gln Thr Val Leu Lys Val Cys Lys Phe Leu
               275                 280                 285
Ala Ile Leu Val Tyr Asn Leu Val Tyr Val Glu Lys Ile Ser Phe
               290                 295                 300
```

Leu Val Ala Cys Arg Val Glu Thr Ser Glu Val Thr Gly Tyr Ala
305 310 315
Ser Phe Cys Cys Asn His Thr Lys Ala His Leu Phe Ser Lys Leu
320 325 330
Ala Phe Cys Tyr Ile Ser Phe Val Cys Ile Tyr Gly Leu Thr Cys
335 340 345
Ile Tyr Thr Leu Tyr Trp Leu Phe His Arg Pro Leu Lys Glu Tyr
350 355 360
Ser Phe Arg Ser Val Arg Glu Glu Thr Gly Met Gly Asp Ile Pro
365 370 375
Asp Val Lys Asn Asp Phe Ala Phe Met Leu His Leu Ile Asp Gln
380 385 390
Tyr Asp Ser Leu Tyr Ser Lys Arg Phe Ala Val Phe Leu Ser Glu
395 400 405
Val Ser Glu Ser Arg Leu Lys Gln Leu Asn Leu Asn His Glu Trp
410 415 420
Thr Pro Glu Lys Leu Arg Gln Lys Leu Gln Arg Asn Ala Ala Gly
425 430 435
Arg Leu Glu Leu Ala Leu Cys Met Leu Pro Gly Leu Pro Asp Thr
440 445 450
Val Phe Glu Leu Ser Glu Val Glu Ser Leu Arg Leu Glu Ala Ile
455 460 465
Cys Asp Ile Thr Phe Pro Pro Gly Leu Ser Gln Leu Val His Leu
470 475 480
Gln Glu Leu Ser Leu Leu His Ser Pro Ala Arg Leu Pro Phe Ser
485 490 495
Leu Gln Val Phe Leu Arg Asp His Leu Lys Val Met Arg Val Lys
500 505 510
Cys Glu Glu Leu Arg Glu Val Pro Leu Trp Val Phe Gly Leu Arg
515 520 525
Gly Leu Glu Glu Leu His Leu Glu Gly Leu Phe Pro Gln Glu Leu
530 535 540
Ala Arg Ala Ala Thr Leu Glu Ser Leu Arg Glu Leu Lys Gln Leu
545 550 555
Lys Val Leu Ser Leu Arg Ser Asn Ala Gly Lys Val Pro Ala Ser
560 565 570
Val Thr Asp Val Ala Gly His Leu Gln Arg Leu Ser Leu His Asn
575 580 585
Asp Gly Ala Arg Leu Val Ala Leu Asn Ser Leu Lys Lys Leu Ala
590 595 600
Ala Leu Arg Glu Leu Glu Leu Val Ala Cys Gly Leu Glu Arg Ile
605 610 615
Pro His Ala Val Phe Ser Leu Gly Ala Leu Gln Glu Leu Asp Leu
620 625 630
Lys Asp Asn His Leu Arg Ser Ile Glu Glu Ile Leu Ser Phe Gln
635 640 645
His Cys Arg Lys Leu Val Thr Leu Arg Leu Trp His Asn Gln Ile
650 655 660
Ala Tyr Val Pro Glu His Val Arg Lys Leu Arg Ser Leu Glu Gln
665 670 675
Leu Tyr Leu Ser Tyr Asn Lys Leu Glu Thr Leu Pro Ser Gln Leu
680 685 690
Gly Leu Cys Ser Gly Leu Arg Leu Leu Asp Val Ser His Asn Gly
695 700 705
Leu His Ser Leu Pro Pro Glu Val Gly Leu Leu Gln Asn Leu Gln
710 715 720

His Leu Ala Leu Ser Tyr Asn Ala Leu Glu Ala Leu Pro Glu Glu
725 730 735
Leu Phe Phe Cys Arg Lys Leu Arg Thr Leu Leu Leu Gly Asp Asn
740 745 750
Gln Leu Ser Gln Leu Ser Pro His Val Gly Ala Leu Arg Ala Leu
755 760 765
Ser Arg Leu Glu Leu Lys Gly Asn Arg Leu Glu Ala Leu Pro Glu
770 775 780
Glu Leu Gly Asn Cys Gly Gly Leu Lys Lys Ala Gly Leu Leu Val
785 790 795
Glu Asp Thr Leu Tyr Gln Gly Leu Pro Ala Glu Val Arg Asp Lys
800 805 810
Met Glu Glu Glu

<210> 3
<211> 1420
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5678557CB1

<400> 3
ccgcccggg actaagccgg ggagcgcatc ccggctactg cgggtcctgg gtcttcacct 60
gcggagcctt acggcagctg agcggtggga gggacctgag ccgcggcgct aggatgggaa 120
acagtgcgct ccgcgctcat gtggaaacgg cgcagaaaac tggtgtcttt cagcttaagg 180
accgagggct gaccgagttc cccgcagact tgcagaagct gacgagcaat ctcaggacca 240
tcgacttgtc caacaacaag atcgaaagcc taccgccttt gctgatagga aagttcactc 300
tgctgaagag cctctccctg aacaacaaca aactgactgt tctgcctgat gagatatgca 360
atctgaaaaa actagagacg ctaagcctaa acaacaatca cctttagagag ctgccgtcta 420
cctttgggca actctctgcc ctcaagaccc tgagcctctc tgggaaccaa ctgggagcat 480
tacctcccca actttgtagc ctacggcacc tggatgtgat ggatctctct aagaaccaga 540
ttcgaagtat acctgactca gtgggagagc tgcaagtcat cgaactcaac ctcaaccaga 600
atcagatatc tcagatctca gtgaagatat cttgctgtcc acgccttaaa attcttcgcc 660
tggaagagaa ttgtcttgag ctcagcatgc ttccccagag catcctcagt gattcccaga 720
tctgtctgct tgctgtggaa ggcaatcttt ttgaaataaa gaaacttcga gaactggaag 780
gctatgataa gtacatggag aggttcacag ccaccaagaa gaagtttgcg tgaagttctc 840
caggactatg gaaaccttac aggatactga cttagaacct ctgttggaat gtggctgagt 900
caaagcctcc tgttgttgtt aggggtatct acagtaagga gatgatactt caggagatta 960
tatttcactc aatgatcttt tctcatttca gggctcttct caaataagct aaaagaaaaa 1020
ggatcaggag acaggaaaag tcttccgttt tgagtcatga gtagggcaat agacaaggtt 1080
ctcttcaaaa ccatcattag tttggcttta agaaaccagt agctagctgc tatttatatg 1140
gtgaggaggt gctgcctggt aacagaatag ctccacacca cagcttgaga ttttgtttag 1200
tttcactgtg tgagctttca taaagtctgt tgccattcca tctctgtgtt aacacttcat 1260
atttttatga aattcagata atttgtgaga ggctggcatg gatctaagga tttattattt 1320
ttattctagt ccatcagttc agtcgcagtt tttatactag gactttagga tgtacataaa 1380
tgtgtgactg ttgtcttgat taaaagtgca ctttggcctg 1420

<210> 4
<211> 3278
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7474459CB1

<400> 4
atggggtttc accatgttgg ccaggctgga ctcgaactcc tgacctcagg cagcatgatc 60
ccagtggccg agttcaagca gttcacggaa cagcagcctg cgttcaaggt gctcaaaccc 120
tggtgggacg tgctggccga gtacctcacc gtggccatgc tcatgattgg ggtctttggc 180
tgcaccctcc aggtgacaca ggacaagatc atctgtctac ccaatcatga gctccaggag 240
aacttatcag aggccccgtg ccagcaattg ctgcctcggg ggatccctga gcagattggg 300
gccctgcagg aggttaaagg ccttaagaac aatttggacc tgcagcaata cagctttatt 360
aaccagctgt gttatgagac ggccctgcac tggtatgcca agtacttccc ttacctcgtg 420
gtcattcaca cactcatctt catggtctgc accagtttct ggttcaagtt cctggcacc 480
agctccaaga ttgaacactt catctccatc ctgggcaagt gtttcgactc tccatggacc 540
accagggccc tatccgaggt ctccggggag aaccagaagg gcccagcagc caccgaacgg 600
gctgcggcca ccatagtggc catggcaggg accgggccgg ggaaggcagg ggagggtgag 660
aaggagaaag tgctggcgga accggagaag gtggtgaccg agcctccagt tgtcaccctg 720
ttggacaaga aggagggtga gcaagccaaa gccctgtttg agaaggtgaa gaagttccgc 780
atgcacgtgg aagagggcga catcctgtac accatgtaca tccgacagac ggtgctgaaa 840
gtgtgtaagt tcctggccat cctggtctac aacctggtct atgtggagaa gatcagtttc 900
ctggtggcct gtagggtgga gacgtcagag gtcaccgggct acgccagctt ctgctgcaac 960
cacaccaagg cccacctctt ctccaagctg gccttctgtt acatctcctt tgtgtgcatc 1020
tacggactta cctgcatcta cacgctctac tggctcttcc accggcccct caaggagtac 1080
tcctttccgtt ccgtgcggga ggagactggc atgggggaca ttcctgacgt caagaatgac 1140
ttcgccttca tgctgcacct catcgatcag tacgactccc tctactccaa gcgcttcgcc 1200
gtctttcctgt ccgaggtcag cgaaagccgt ctaaagcagc tcaatctcaa ccacgagtgg 1260
acgccgaga agcttcgaca gaagctgcag cgcaatgccg cgggccggct ggagctggcc 1320
ctctgcatgc tgccgggtct gcccgacacc gtctttgagc tcagtgaggt ggagtcactc 1380
aggctggagg ccatctgcga tatcaccttc ccccggggc tgtcacagct ggtgcacttg 1440
caggagctca gcttgctcca ctcgcccgcc aggctaccct tctccttgca ggtcttcctg 1500
cgggaccacc tgaaggtgat gcgcgtcaaa tgcgaggagc tccgcgaggt gccgctttgg 1560
gtgtttgggc tgcggggctt ggaggagctg cacctggagg ggcttttccc cdaggagcta 1620
gctcgggcag ccaccctgga gagcctccgg gagctgaagc agctcaaggt gttgtccctc 1680
cggagcaacg ccgggaaggt gccagccagt gtgaccgacg ttgctggcca cctgcagagg 1740
ctcagcctgc acaacgatgg ggcccgtctg gttgccctga acagcctcaa gaagctggcg 1800
gcattgcggg agctggagct ggtggcctgc gggctggagc gcatccccca tgcagtgttc 1860
agcctgggtg cgctgcagga actgacctc aaggacaacc acctgcgctc catcgaggaa 1920
atcctcagct tccagcactg ccggaagctg gtcacgctca ggctgtggca caaccagatc 1980
gcctacgtcc ctgagcacgt gcggaagctc aggagcctgg agcagctcta cctcagctac 2040
aacaagctgg agaccctgcc ctcccagctc ggcctgtgct caggcctccg tctgctggat 2100
gtgtcccaca atgggctaca ctccctgcca cccgaggtgg gcctcctgca gaacctacag 2160
cacctggccc tctcctacaa tgccctggag gccctgcccg aagagctctt cttctgccgc 2220
aagctgcgga cgttgcttct gggcgacaac cagctgagcc agctctcgcc ccacgtgggt 2280
gccctcagag ccctcagccg cctggagctc aaaggcaacc gcttagaggc gctgccagaa 2340
gaacttggca actgtggggg gctcaagaag gcggggctcc tggtggaaga cacgctttac 2400
cagggtctgc cggcagaagt gcgggacaag atggaggagg aatgaagctg gggtgggccc 2460
gttttaggta gagccttaaa aatgcttctg ccctggaatc tcaaccattg tcttccaaga 2520
taggaagcca agtgggtcca ggccaggaga tgggggggc gggggcagct gtgtcatctt 2580
tctgggccc aggaggatct gggctggttt gtctggggag acagacagga tgttgtggag 2640
ctggggtgga acctggtatg gagggattaa ctcagtcatg gcattctccg accaaaacca 2700
cacctgtgtc tctggcaggc tggctggcct tgctcccatc cctagaactg ctgcctctcc 2760
ctggatattc cagctcaatt agtgccacat atgggggaaa cgacacatcc cagtgggatt 2820
tccaacactc ccctcccca tgcaacaaag caacttactt ctggagttct ctcccaagga 2880
gaggacacag acacagttgt ttgctgtgtt atatgttagc tccgaacaat ggtttctcatt 2940
tggctaagca tcaaaatcac ctagggagtc ggtgcaaaac aaaatatccc agtcccctcc 3000
cctgaaacac tgactcagga ggtttggttg ggggccagga gtctgttcct aaatattcca 3060
ggtagttctg gtgcaggtaa gtggccctga gacagtatgt tgggaaatgc tgacgtaaag 3120

gtatcagggc cgggcgctgt ggctcatgac tataatccca gctgtttgag aggccaatgc 3180
aggaggatgg ttgagctcag gatttcgaga tcagcctggg taacatagcg agaccccaac 3240
tctgccaaaa aaaaaaaatg gggtctccct ttctaatt 3278

【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
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059286 A3

(51) International Patent Classification[7]: C12N 9/00

(21) International Application Number: PCT/US01/49212

(22) International Filing Date:
18 December 2001 (18.12.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/257,193 19 December 2000 (19.12.2000) US
60/260,111 5 January 2001 (05.01.2001) 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)*: **BAUGHN, Mariah** [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). **TRIBOULEY, Catherine, M.** [FR/US]; 1121 Tennessee Street, #5, San Francisco, CA 94107 (US). **WALIA, Narinder, K.** [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). **LU, Yan** [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (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, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
17 July 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 02/059286 A3

(54) Title: ADENYLATE CYCLASES

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

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/49212

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

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, BIOSIS, EMBASE, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 January 1998 (1998-01-01) Database accession no. O13328 XP002223065 the whole document	1-56,58
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) Database accession no. Q9W3T9 XP002223066 the whole document	1,3,6,7, 9,11,17, 31,32
X	DATABASE SWISSPROT 'Online! 1 November 1996 (1996-11-01) Database accession no. Q23526 XP002223067 the whole document	1,3,6,7, 9,11,17, 31,32

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 November 2002	01.04.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Chavanne, F

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/49212

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! 24 November 1998 (1998-11-24) Database accession no. AI284140 XP002223068 the whole document ---	3-7, 12-16
X	DATABASE EMBL 'Online! 14 June 2000 (2000-06-14) Database accession no. BE019615 XP002223069 the whole document ---	3,6,7
X	DATABASE EMBL 'Online! 14 December 1999 (1999-12-14) Database accession no. AC018362 XP002223070 nt 80596-81229 ---	3,6,7
X	DATABASE EMBL 'Online! 28 November 2000 (2000-11-28) Database accession no. BF354403 XP002223071 the whole document ---	3,6,7
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200158 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2001-524255 XP002223103 SEQ ID No.3763 and 3764 -----	1,3,6,7, 9,11,17, 31,32

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/49212

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 19, 22, 25, 33-35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [ ] Claims Nos.:
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:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [X] 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.:

1-55 (partially), 56 and 58 (completely)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01 /49212

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 19, 22, 25 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.

Although claims 33-35 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

International Application No. PCT/US 01 A9212

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-55 (partially), 56 and 58 (completely)

Polypeptide of SEQ ID No.1 encoded by the polynucleotide of SEQ ID No.3, recombinant polynucleotide comprising said polynucleotide, host cells and organisms transformed with said recombinant polynucleotide, methods for producing said polypeptide, antibody specifically binding to said polypeptide, compositions comprising said polypeptide, screening, diagnosis and treatment methods based on the use of said polypeptide or polynucleotide.

2. Claims: 1-55 (partially), 57 and 59 (completely)

Polypeptide of SEQ ID No.2 encoded by the polynucleotide of SEQ ID No.4, recombinant polynucleotide comprising said polynucleotide, host cells and organisms transformed with said recombinant polynucleotide, methods for producing said polypeptide, antibody specifically binding to said polypeptide, compositions comprising said polypeptide, screening, diagnosis and treatment methods based on the use of said polypeptide or polynucleotide.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 3/08	Ａ６１Ｐ 3/08		４Ｂ０６５
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 9/10		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 9/12	Ａ６１Ｐ 9/12		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 11/00	Ａ６１Ｐ 11/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 15/00	Ａ６１Ｐ 15/00		
Ａ６１Ｐ 15/10	Ａ６１Ｐ 15/10		
Ａ６１Ｐ 21/04	Ａ６１Ｐ 21/04		
Ａ６１Ｐ 25/00	Ａ６１Ｐ 25/00		
Ａ６１Ｐ 25/04	Ａ６１Ｐ 25/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 25/08	Ａ６１Ｐ 25/04		
Ａ６１Ｐ 25/14	Ａ６１Ｐ 25/08		
Ａ６１Ｐ 25/16	Ａ６１Ｐ 25/14		
Ａ６１Ｐ 25/22	Ａ６１Ｐ 25/16		
Ａ６１Ｐ 25/28	Ａ６１Ｐ 25/22		
Ａ６１Ｐ 27/02	Ａ６１Ｐ 25/28		
Ａ６１Ｐ 31/04	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ａ６１Ｐ 37/06	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ｃ０７Ｋ 1/22	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ｃ０７Ｋ 16/40	Ｃ０７Ｋ 1/22		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ０７Ｋ 16/40		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 9/88	Ｃ１２Ｎ 9/88		
Ｃ１２Ｎ 15/02	Ｃ１２Ｐ 21/08		
Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｇ０１Ｎ 33/577	Ｂ	
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｆ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｃ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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 トリボレー、キャサリーン・エム

アメリカ合衆国カリフォルニア州９４１０７・サンフランシスコ・＃５・テネシーストリート　１１２１
(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９４５８７・ユニオンシティ・＃７１２・ユニオンスクエア　３３
(72)発明者　リュ、ヤン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９４３０３・パロアルト・コリーナウェイ　３８８５

Ｆターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA07 BA31 BA44 BA61 CA01 CA04 CA06 CA07
CA09 CA10 CA11 DA02 DA05 DA06 EA02 EA04 FA02 FA10
GA03 GA11 GA19 HA01 HA13
4B050 CC03 CC04 DD11 FF08C FF14E LL01 LL03
4B063 QA13 QQ28 QQ42 QQ44 QQ52 QQ62 QR07 QR35 QR55 QR56
QR59 QR60 QR62 QR84 QS03 QS05 QS15 QS25 QS34 QS36
QS39 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA90X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA27 CA44 CA46
4C084 AA01 AA17 DC50 NA14 ZA011 ZA121 ZA151 ZA161 ZA181 ZA361
ZA421 ZA431 ZA591 ZA811 ZB081 ZB261 ZB331 ZB351 ZC211
4C085 AA13 CC02 DD24 DD63
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 DA89
EA20 EA50 FA72 FA73 FA74 GA20 GA26

专利名称(译)	腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶		
公开(公告)号	JP2005500814A	公开(公告)日	2005-01-13
申请号	JP2002559573	申请日	2001-12-18
[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	ボーグンマライア トリボレーキャサリーンエム チョーラナリンダーケイ リュヤン		
发明人	ボーグン、マライア トリボレー、キャサリーン·エム チョーラ、ナリンダー·ケイ リュ、ヤン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61P3/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/22 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/88 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61P3/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C12N9/88		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K49/00.Z A61P3/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/06 A61P15/00 A61P15/10 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/00.101 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/06 C07K1/22 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/88 C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/577.B C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02 C12N15/00.C		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA31 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA01 4B024/HA13 4B050/CC03 4B050/CC04 4B050/DD11 4B050/FF08C 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA13 4B063/QQ28 4B063/QQ42 4B063/QQ44 4B063/QQ52 4B063/QQ62 4B063/QR07 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR60 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS03 4B063/QS05 4B063/QS15 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA121 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA361 4C084/ZA421 4C084/ZA431 4C084/ZA591 4C084/ZA811 4C084/ZB081 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZC211 4C085/AA13 4C085/CC02 4C085/DD24 4C085/DD63 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74 4H045/GA20 4H045/GA26		
优先权	60/257193 2000-12-19 US		

	60/260111 2001-01-05 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了人腺苷酸和鸟苷酸环化酶（ADGUC）以及鉴定和编码ADGUC的多核苷酸。 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ADGUC的异常表达有关的疾病的方法。