

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-513620

(P2004-513620A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/46	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 2 4
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/16	4 B O 5 0
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/18	4 B O 6 3
		4 B O 6 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 219 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-510665 (P2002-510665)	(71) 出願人	301005050
(86) (22) 出願日	平成13年6月14日 (2001.6.14)		インサイト・ゲノミックス・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月13日 (2002.12.13)		アメリカ合衆国カリフォルニア州94304・パロアルト・ポータードライブ 3160
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/019442	(74) 代理人	100089266
(87) 国際公開番号	W02001/096546		弁理士 大島 陽一
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)	(72) 発明者	オウーヤング、ジャニス
(31) 優先権主張番号	60/212, 447		アメリカ合衆国カリフォルニア州94005・プリズペーン・ゴールデンイーグルレーン 233
(32) 優先日	平成12年6月16日 (2000.6.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/213, 746		
(32) 優先日	平成12年6月22日 (2000.6.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/215, 210		
(32) 優先日	平成12年6月29日 (2000.6.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロテインホスファターゼ

(57) 【要約】

本発明はヒトプロテインホスファターゼ (P P) および P P を同定し、コードするポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、発現ベクター、宿主細胞、抗体、アゴニストおよびアンタゴニストをも提供する。本発明はまた、 P P の異常発現に関連する疾患を診断、治療または予防する方法をも提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) 乃至 (d) 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 - 9 (配列番号 1 乃至 9) を有する群から選択したアミノ酸配列を含むポリペプチド

(b) SEQ ID NO: 1 - 7 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90% が同一であるようなアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド

(c) SEQ ID NO: 8 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 80% が同一であるようなアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド

(d) SEQ ID NO: 1 - 9 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

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

【請求項 2】

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

【請求項 3】

請求項 1 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド

【請求項 5】

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

【請求項 6】

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

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の組換えポリヌクレオチドを含む遺伝形質転換体。

【請求項 9】

請求項 1 のポリペプチドを生産する方法であって、以下の過程を含む方法。

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

(b) そのように発現した前記ポリペプチドを回収する過程。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のポリペプチドと特異的に結合する単離された抗体。

【請求項 11】

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

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

(b) SEQ ID NO: 10 - 16 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 90% が同一であるような天然のポリヌクレオチド

(c) SEQ ID NO: 17 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも 80% が同一であるような天然のポリヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド

(d) (a) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(e) (b) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

(f) (c) のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

(g)(a)~(f)のRNA等価物

【請求項12】

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

【請求項13】

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

(a)前記サンプル中の前記標的ポリヌクレオチドに相補的な配列を含む少なくとも20の連続したヌクレオチドを含むプローブを用いて前記サンプルをハイブリダイズする過程(ただし、前記プローブと前記標的ポリヌクレオチドまたは断片の間でハイブリダイゼーション複合体が形成されるような条件下で、前記プローブが前記標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする)と、

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

【請求項14】

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

【請求項15】

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

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

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

【請求項16】

請求項1のポリペプチドと、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項17】

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

【請求項18】

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

【請求項19】

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

(a)請求項1のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、

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

【請求項20】

請求項19に記載の方法によって同定したアゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項21】

機能的なPPの発現の低下に関連する疾患や病態の治療方法であって、そのような治療が必要な患者に請求項20の組成物を投与することを特徴とする治療方法。

【請求項22】

10

20

30

40

50

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

- (a) 請求項 1 のポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
- (b) 前記サンプルにおいてアンタゴニスト活性を検出する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 2 3】

請求項 2 2 に記載の方法によって同定したアンタゴニスト化合物と、薬剤として許容できる賦形剤とを含む組成物。

【請求項 2 4】

機能的な P P 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 2 3 の組成物を投与することを含むことを特徴とする治療方法。 10

【請求項 2 5】

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

- (a) 適切な条件下で請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させるステップと、
- (b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの試験化合物との結合を検出し、それによって請求項 1 に記載のポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 6】

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

- (a) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性が許容された条件下で、請求項 1 に記載のポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、
- (b) 請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を試験化合物の存在下で算定する過程と、
- (c) 試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を、試験化合物の不存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下での請求項 1 に記載のポリペプチドの活性の変化が、請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を標示することを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

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

- (a) 前記標的ポリヌクレオチドの発現に好適な条件下で、前記標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを化合物に曝露する過程と、
- (b) 前記標的ポリヌクレオチドの変異発現を検出する過程と、
- (c) 可変量の前記化合物の存在下と前記化合物の不存在下で、前記標的ポリヌクレオチドの発現を比較する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 8】

試験化合物の毒性を算定する方法であって、

- (a) 核酸を含む生物学的サンプルを前記試験化合物で処理する過程と、 40
- (b) 処理した前記生体サンプルの核酸と、請求項 1 1 のポリヌクレオチドの少なくとも 2 0 の連続するヌクレオチドを含むプローブをハイブリダイズさせるステップであって、このハイブリダイゼーションが、前記プローブと前記生体サンプルの標的ポリヌクレオチドとの間で特異的なハイブリダイゼーション複合体が形成される条件下で行われ、前記標的ポリヌクレオチドが、請求項 1 1 のポリヌクレオチドのポリヌクレオチド配列またはその断片を含むポリヌクレオチドである、前記ステップと、
- (c) ハイブリダイゼーション複合体の収量を定量するステップと、
- (d) 前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量を、処理されていない生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合体の量と比較する過程とを含み、前記処理された生物学的サンプル中の前記ハイブリタイゼーション複合 50

体の量の差が、前記試験化合物の毒性を標示することを特徴とする方法。

【請求項 29】

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

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

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

【請求項 30】

前記抗体が、

(a) キメラ抗体

(b) 単鎖抗体

(c) F a b 断片

(d) F (a b ')₂ 断片

(e) ヒト化抗体 のいずれかであることを特徴とする請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 31】

請求項 10 に記載の抗体と、許容できる賦形剤とを含む化合物。

【請求項 32】

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

【請求項 33】

前記抗体が標識されることを特徴とする請求項 31 に記載の化合物。

【請求項 34】

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

【請求項 35】

請求項 10 に記載の抗体の特異性を有するポリクローナル抗体を調製する方法であって、

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、S E Q I D N O : 1 - 9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体を単離する過程と、

(c) 前記単離された抗体をポリペプチドでスクリーニングし、それによって、S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するようなポリクローナル抗体を同定する過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 36】

請求項 35 に記載の方法で産出した抗体。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項 38】

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

(a) 抗体反応を誘発する条件下で、S E Q I D N O : 1 - 9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫抗原性断片を用いて動物を免疫化する過程と、

(b) 前記動物から抗体産出細胞を単離する過程と、

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

(d) 前記ハイブリドーマ細胞を培養する過程と、

(e) S E Q I D N O : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異結合するような前記培養モノクローナル抗体から単離する過程とを含むことを

10

20

30

40

50

特徴とする方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法で産出したモノクローナル抗体。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の抗体及び適切なキャリアを含む化合物。

【請求項 41】

F a b 発現ライブラリのスクリーニングにより前記抗体を産出することを特徴とする請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 42】

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 10 に記載の抗体。 10

【請求項 43】

SEQ ID NO : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを検出する方法であって、

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

(b) 特異結合を検出する過程とを含み、該特異結合が、SEQ ID NO : 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドがサンプル中に存在することを標示することを特徴とする方法。

【請求項 44】

SEQ ID NO : 1 - 9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドを精製する方法であって、

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

(b) 前記サンプルから前記抗体を分離し、SEQ ID NO : 1 - 9 からなる群から選択したアミノ酸配列を有する精製ポリペプチドを得る過程とを含むことを特徴とする方法。

【請求項 45】

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

【請求項 46】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。 30

【請求項 47】

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

【請求項 48】

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

【請求項 49】

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

【請求項 50】

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

【請求項 51】

SEQ ID NO : 7 のアミノ酸配列を含む請求項 1 に記載のポリペプチド。 40

【請求項 52】

SEQ ID NO : 8 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 53】

SEQ ID NO : 9 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 54】

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

【請求項 55】

SEQ ID NO : 11 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレ 50

オチド。

【請求項 56】

SEQ ID NO : 12 のポリヌクレオチド配列を有する請求項 11 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 57】

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

【請求項 58】

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

10

【請求項 59】

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

【請求項 60】

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

【請求項 61】

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

【請求項 62】

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

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、プロテインホスファタ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免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・予防に関する。本発明はさらに、プロテインホスファターゼの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価に関する。

30

【0002】

(発明の背景)

可逆的なタンパク質のリン酸化は、真核細胞の細胞内での様々な現象を調節するために広く利用されている。一般的な哺乳動物細胞における活性化タンパク質の10%以上がリン酸化されていると推定される。キナーゼは、高エネルギーのリン酸基をアデノシン三リン酸(ATP)から標的タンパク質のヒドロキシアミノ酸残基であるセリン、トレオニン、またはチロシンに転移する。これとは対照的に、ホスファターゼはこれらのリン酸基を除去する。ホルモン、神経伝達物質、および成長因子、および分化因子を含む細胞内外シグナルは、キナーゼを活性化し、そのようなキナーゼは最終的なエフェクタータンパク質の活性化酵素または細胞表面受容体として存在するが、シグナル伝達経路中に存在することもある。キナーゼのカスケードおよびセカンドメッセンジャー分子に対するキナーゼの感受性も生じる。このシステムによって、弱いシグナル(例えば、わずかにしか存在しない成長因子分子)の増幅や、弱いシグナルの多くを全か無かの応答へ変換することが可能になる。次に、ホスファターゼは細胞におけるリン酸化の程度の決定に必須であり、キナーゼと共に代謝酵素活性、細胞増殖、細胞の成長および分化、細胞接着、および細胞周期の進行などの重要な細胞プロセスを調節する。

40

【0003】

一般的に、プロテインホスファターゼは、ホスホアミノ酸基質選択性に基づいて、セリン/トレオニン特異性またはチロシン特異性のいずれかによって特徴づけられる。しかしながら、或る種のホスファターゼ(DSP:二重特異性ホスファターゼ)は、リン酸化した

50

チロシン、セリン、またはトレオニン残基に作用し得る。プロテインセリン/トレオニンホスファターゼ (PSP) は、細胞内での多くの cAMP 仲介性ホルモン応答の重要な制御因子である。プロテインチロシンホスファターゼ (PTP) は、細胞周期および細胞内シグナル伝達プロセスにおいて重要な役割を果たす。別のファミリーのホスファターゼは、酸性ホスファターゼ、またはヒスチジン酸性ホスファターゼ (HAP) ファミリーで、そのメンバーは酸性の pH 条件下でリン酸エステルを加水分解する。

【0004】

PSP は細胞質内、核、およびミトコンドリアに見られ、多くの組織、特に脳において細胞骨格および膜構造に結合している。或る種の PSP は、活性のために Ca^{2+} または Mn^{2+} などの 2 価の陽イオンを必要とする。PSP は、糖代謝、筋収縮、蛋白合成、T 細胞機能、神経作用、卵成熟、および肝代謝において重要な役割を果たす (Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 453 - 508 の概説を参照)。PSP は 2 つのクラスに分類することができる。PPP クラスには、PP1、PP2A、PP2B/カルシニユリン、PP4、PP5、PP6、および PP7 が含まれる。このクラスのメンバーは、1 個或いは複数の調節サブユニットが結合した高度に保存されたシグネチャ配列を有する相同な触媒サブユニットを含む (PROSITE PDOC00115)。更に、足場 (Scaffolding) 分子および固着 (Anchoring) 分子との相互作用によって、PSP の細胞内局在性および基質特異性が決定される。PPM クラスは、PP2C に密接に関連した幾つかのアイソフォームから成り、PPP クラスには進化的な関連性が存在しない。

10

20

【0005】

PP1 は、サイクリック AMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) によってリン酸化した多くのタンパク質を脱リン酸化し、細胞における多くの cAMP 仲介性ホルモン応答の重要な制御因子である。幾つかのアイソフォームが同定されているが、 α 型および β 型は同じ遺伝子の選択的スプライシングによって生成される。PP1 に対して遍在性の標的タンパク質および組織特異的標的タンパク質が同定された。脳において、ドーパミンおよび 32 kDa のアデノシン 3', 5' - リン酸調節性ホスホプロテイン (DARPP-32) による PP1 活性化の障害が、新線条体ニューロンにおける正常なドーパミン応答に必要である (Price, N. E. および M. C. Mumby (1999) *Curr. Op. Neurobiol.* 9: 336 - 342 を参照)。PP1 および PP2A が微小血管内皮細胞の細胞運動を制限することが分かっており、脈管形成の障害に PSP がある役割を果たしていると思われる (Gabel, S. 他 (1999) *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121: 463 - 468)。

30

【0006】

PP2A は、主なセリン/トレオニンホスファターゼである。コア PP2A 酵素は、更なる調節サブユニット (B) を動員する 65 kDa の足場サブユニット (scaffolding subunit) (A) と結合した 1 つの 36 kDa の触媒サブユニット (C) から成る。B サブユニットをコードする 3 つの遺伝子ファミリー (PR55、PR61、および PR72) が知られており、そのそれぞれが複数のアイソフォームを含み、更なるファミリーが存在し得る (Millward, T. A. 他 (1999) *Trends Biosci.* 24: 186 - 191)。これらの「B 型」サブユニットは細胞型特異的および組織特異的であって、基質特異性、酵素活性、およびホロ酵素の細胞内局在性を決定する。PR55 ファミリーは高度に保存されていて、保存されたモチーフを有する (PROSITE PDOC00785)。PR55 によって、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ (MAPK) および MAPK キナーゼ (MEK) に対する PP2A 活性が上昇する。PP2A は、MAPK 活性化部位を脱リン酸化し、細胞の有糸分裂への移行を障害する。CKII キナーゼ触媒サブユニット、ポリオーマウイルス中およびスモール T 抗原、および SV40 スモール t 抗原を含む幾つかのタンパク質が、PP2A のコア酵素結合について PR55 と競合し得る。ウイルスはこのメカニズムを利用して PP2A 活性を障害し、細胞周期を介する細胞の進行を刺激する (Pallas, D. C. 他 (1992) 40

50

J. Virol. 66:886-893)。MAPキナーゼの発現の変化はまた、癌、炎症性の疾患、免疫異常、および成長および発達に影響を与える疾患を含む様々な症状に関係する。実際、PP2Aは*in vitro*で30種以上のプロテインキナーゼを脱リン酸化してその活性を調節する。また、その他の研究結果から、PKB、PKC、カルモジュリン依存性キナーゼ、ERKファミリーのMAPキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、およびIBキナーゼなどのキナーゼについても*in vivo*で同様に活性調節を行っていることが示唆された(Milward 他, 前出)。PP2A自体が、CKIキナーゼおよびCKIIキナーゼの基質であり、ポリカチオン巨大分子によって刺激され得る。PP2A様ホスファターゼは、哺乳動物サイクリンAおよびBのG1期破壊を維持するために必要である(Bastians, H. 他(1999) Mol. Biol. Cell 10:3927-3941)。PP2Aは脳において主に作用し、神経フィラメントの安定性および正常な神経機能の調節、特に微少血管関連タンパク質tauのリン酸化に関係すると考えられる。tauの過剰なリン酸化がアルツハイマー病に見られる神経変性を引き起こすと提案されている(Price および Mumbly, 前出)。

【0007】

PP2Bすなわちカルシニユリンは、 Ca^{2+} 活性化二量体ホスファターゼであって、特に脳に多量に存在する。PP2Bは、触媒サブユニットおよび調節サブユニットから成り、カルシウム/カルモジュリン複合体の結合によって活性化される。カルシニユリンは、免疫抑制薬シクロスポリンおよびFK506の標的である。その他の細胞因子と共にこれらの薬剤は、カルシニユリンと相互作用してホスファターゼ活性を阻害する。T細胞では、この作用によって、転写因子のNF-ATファミリーのカルシウム依存性活性化が阻害され、免疫抑制が起こる。このファミリーは広く分布し、カルシニユリンがその他の組織においても遺伝子の発現を調節する可能性が高い。ニューロンでは、カルシニユリンは、神経伝達物質放出の阻害から後シナプスNMDA受容体結合カルシウムチャネルの脱感作、および長期の記憶に至るまでの機能を調節する(Price および Mumbly, 前出)。

【0008】

PPPクラスのその他のメンバーが近年同定された(Cohen, P. T. (1997) Trends Biochem. Sci 22:245-25)。その1つであるPP5は、テトラトリコペプチドリピートを有する調節ドメインを含む。PP5は、*in vitro*で陰イオン性リン脂質および多価不飽和脂肪酸によって活性化され、心房性ナトリウム利尿ペプチドまたはステロイドホルモンによって調節されるシグナル伝達経路を含む幾つかのシグナル伝達経路に関与すると思われる(Andreeva, A. V. および M. A. Kutuzov (1999) Cell Signal. 11:555-562を参照)。

【0009】

PP2Cは、広い基質特異性を有する最大42 kDaの単量体であって、その活性が二価の陽イオン(主に Mn^{2+} または Mg^{2+})に依存する。PP2Cタンパク質は、陽イオン結合に関係するアスパラギン酸残基を含む不変のDGHモチーフを有する、保存されたN末端領域を共有する(PROSITE PDOC00792)。標的タンパク質とPP2Cの作用を調節するメカニズムは、同定されていない。PP2Cは、ストレス応答性p38およびJunキナーゼ(JNK)経路を阻害することが分かっている(Takekawa, M. 他(1998) EMBO J. 17:4744-4752)。

【0010】

PSPとは対照的に、チロシン特異的ホスファターゼ(PTP)は、大きさおよび構造が様々であって(20 kDa~100 kDa以上)一般に単量体のタンパク質であり、主に細胞膜を通過するシグナル伝達において機能する。PTPは、可溶性ホスファターゼか、或いはホスファターゼドメインを含む膜貫通受容体タンパク質のいずれかに分類される。全てのPTPは、活性部位を含む約300のアミノ酸の保存された触媒ドメインを共有する。この活性部位の共通配列には、触媒作用中にリン酸部分に求核攻撃をするシステイ

ン残基を含む (Neel, B. G. および N. K. Tonks (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 193 - 204)。受容体 PTP は、可変長の N 末端細胞外ドメインと、膜貫通領域と、通常は 2 つの同一の触媒ドメイン有する細胞質領域とから成る。初めの触媒ドメインのみが酵素活性を有するように見えるが、第 2 の触媒ドメインも第 1 の触媒ドメインの基質特異性に影響を与えらると思われる。幾つかの受容体 PTP の細胞外ドメインは、フィブロネクチン様リピート、免疫グロブリン様ドメイン、MAM ドメイン (接着機能を有する可能性が高い細胞外モチーフ)、または炭酸脱水素酵素様ドメイン (PROSITE PDOC 00323) を含む。このような様々な構造モチーフによって、PTP の大きさおよび特異性が多様になっている。

PTP は、細胞接着、リンパ球活性化、および細胞増殖などの生体プロセスにおいて重要な役割を果たす。PTP μ および PTP δ は、細胞 - 細胞接触に関与し、カドヘリン/カテニン機能を調節するであろう。幾つかの PTP が細胞の進展、接着斑、および細胞運動に影響を与えているが、そのほとんどがインテグリン/チロシンキナーゼシグナル伝達経路によって行なわれる (前出の Neel, B. G. および N. K. Tonks を参照)。CD45 ホスファターゼは、シグナル伝達およびリンパ球活性化を調節する (Ledbetter, J. A. 他 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8628 - 8632)。Src - ホモロジー 2 ドメインを有する可溶性 PTP (SHP) が同定された。このことは、これらの分子が受容体チロシンキナーゼと相互作用することを示唆するものである。SHP-1 は、造血細胞における Janus ファミリー PTK の調節によって、および T 細胞受容体および c-Kit (Neel および Tonks, 前出、の概説を参照) によるシグナル伝達によって、サイトカイン受容体シグナル伝達を調節する (Neel および Tonks, 前出、を参照)。M 期誘導ホスファターゼは PTK CDC2 を脱リン酸化して活性化し、有糸分裂の誘導において重要な役割を果たし、細胞分裂が導かれる (Sadhv, K. 他 (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5139 - 5143)。加えて、少なくとも 8 種の PTP をコードする遺伝子が、リンパ腫、小細胞肺癌、白血病、腺癌、および神経芽腫を含む様々な腫瘍症状において転座或いは再配列転移された染色体領域にマッピングされた (Charbonneau, H. および N. K. Tonks (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 463 - 493 を参照)。PTP 酵素の活性化部位は、MTM1 遺伝子ファミリーのコンセンサス配列を含む。MTM1 遺伝子は、X 遺伝子に関連した劣性のミオチューブ様筋疾患に関与している。この疾患は、Xq28 に連関される先天的な筋疾患である (Kioschis, P. 他, (1998) *Genomics* 54: 256 - 266)。PTK の多くは発癌遺伝子によってコードされ、発癌遺伝子がチロシンリン酸化活性の増加をしばしば伴うことは、よく知られている。従って、PTP は、細胞におけるチロシンリン酸化のレベルを調節して細胞形質転換および様々な癌の成長を防止或いは逆転し得る可能性がある。この考えは、PTP の過剰な発現により細胞の形質転換を抑制でき、PTP の特異的阻害により細胞形質転換を促進できるという研究結果から支持される (Charbonneau および Tonks, 前出)。

【0011】

二重特異性ホスファターゼ (DSP) は、PSP よりも PTP に構造的に類似している。DSP は、追加の 7 個のアミノ酸残基を有する拡張された PTP 活性化部位モチーフを有する。DSP は、主に細胞増殖に関与しており、細胞周期調節因子である cdc25A、cdc25B、および cdc25C が含まれる。ホスファターゼ DUSP1 および DUSP2 は、チロシン残基およびトレオニン残基の両方において MAPK ファミリーメンバー ERK (細胞外シグナル調節キナーゼ)、JNK (c-Jun N-末端キナーゼ)、および p38 を不活化する (PROSITE PDOC 00323, 前出)。活性化された状態では、これらのキナーゼは、ニューロンの分化、増殖、癌への形質転換、血小板凝集、およびアポトーシスに関与する。従って、DSP はこれらのプロセスの適切な調節に必要である (Muda, M. 他 (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 2

7205 - 27208)。腫瘍抑制因子PTENは、脂質ホスファターゼ活性も示すDSPである。PTENは、細胞外マトリックスとの相互作用を負に調節してアポトーシス感受性を維持すると思われる。PTENは、血管形成の防止に関係する(Giri, D. およびM. Ittmann (1999) Hum. Pathol. 30:419-424)。PTENの発現の異常は、様々な癌に関連する(Tamura, M. 他(1999) J. Natl. Cancer Inst. 91:1820-1828)。

【0012】

ヒスチジン酸ホスファターゼ(HAP、EXPASY EC 3.1.3.2)もまた、酸性ホスファターゼとして知られ、低いpH下で、アルキル基、アリアル基、アシル基のオルトリン酸モノエステル、およびリン酸化されたタンパク質を含む広範囲な基質を加水分解する。HAPは、2つの領域で保存された配列を共有し、どちらも触媒作用に関与するヒスチジン残基のあたりに位置する。HAPファミリーのメンバーには、リソソーム酸性ホスファターゼ(LAP)と前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)が含まれ、両者ともL-酒石酸塩による抑制に感受性を示す(PROSITE PDOC00538)。

10

【0013】

エンドソーム/リソゾーム内のオルトリン酸モノエステルであるLAPは、管理を行っている遺伝子で、その活性は試験されたすべての組織で検知されている(Geier, C. 他(1989) Eur. J. Biochem. 183:611616)。LAP欠損マウスは、進行性の骨格疾患をもち、全身性発作を起こしやすくなる(Saftig, P. 他(1997) J. Biol. Chem. 272:1862818635)。

LAP欠損患者には次の臨床的特徴があることがわかっている：断続的に起こる嘔吐、緊張低下、無気力、強直性発作、末梢出血、発作、幼児期での死亡(Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *200950)。

20

【0014】

前立腺によって生成される前立腺上皮に特異的な分化抗原である、PAPは、前立腺癌の診断するために用いられてきた。前立腺癌内では、PAPの酵素活性が正常又は良性の前立腺肥大細胞に比べると減少していることがわかっている(Foti, A.G. 他(1977) Cancer Res. 37:41204124)。分泌されるタイプと細胞内に留まるタイプの二種類のPAPが同定されている。成熟した分泌されるPAPは精液に検出され、約100Kダルトンの分子量をもつ、グリコシル化されたホモ二量体として活性をもつ。細胞内のPAPは、内在的なチロシンリン酸化タンパク質ホスファターゼ活性を示し、前立腺細胞の成長の調節に関与することが知られている(Meng, T.C. 及びM.F. Lin (1998) J. Biol. Chem. 34:2209622104)。

30

【0015】

イノシトールリン酸ホスファターゼであるシナプトジャニン、イノシトールリン酸をイノシトール環の3、4、5の位置で脱リン酸する。シナプトジャニンは神経末端でクラスリンで覆われたエンドソーム中間物に見つけられるシナプス前部の主要タンパク質であり、クラスリンコートに関与するタンパク質であるEPS15と結合し、その結合はシナプトジャニン-170のC末端領域(Asp-Pro-Pheのアミノ酸の3回繰り返し)で媒介される。更に、この3残基繰り返しは、EPS15のEHドメインの結合部位であることがわかっている(Haffner, C. 他(1997) FEBS Lett. 419:175-180)。加えて、シナプトジャニンはエンドソームタンパク質と原形質膜との相互作用を調節し、シナプス小胞のリサイクリングに関与している可能性もある(Brodin, L. 他(2000) Curr. Opin. Neurobiol. 10:312-320)。シナプトジャニン1遺伝子(Synj1)の標的破壊を受けたマウスの研究は、野生型マウスに見られるより効果的にエンドソーム小胞のコートが形成されていることを支持しており、Synj1が膜とコートタンパク質の相互作用の負調整として機能していることを示唆する。これらの発見は、シナプス小胞リサイクリングで

40

50

イノシトールリン酸代謝が重要な役割を果たしている遺伝的証拠を提供する (Cremona, O. 他 (1999) Cell 99: 179-188)。

【0016】

新規のタンパク質ホスファターゼ、およびそれらをコードするポリヌクレオチドの発見により、新規の組成物を提供することで当分野の要望に応えることができる。この新規の組成物は、免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常の診断・治療・予防において有用であり、また、タンパク質ホスファターゼの核酸配列及びアミノ酸配列の発現における外来性化合物の影響についての評価にも有用である。

【0017】

(発明の概要)

本発明は、総称して「PP」、個別にはそれぞれ「PP-1」、「PP-2」、「PP-3」、「PP-4」、「PP-5」、「PP-6」、「PP-7」、「PP-8」、および「PP-9」と呼ぶタンパク質ホスファタ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: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%が同一であるアミノ酸配列を有する天然のポリペプチド、(c) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1-9を有する群から選択したアミノ酸配列を有するポリペプチドの免疫抗原性断片を含む群から選択した実質上単離されたポリペプチドを提供する。一実施態様では、SEQ ID NO: 1-9のアミノ酸配列を含む実質上単離されたポリペプチドを提供する。

10

20

30

【0018】

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

【0019】

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

40

【0020】

また、本発明は(a) SEQ ID NO: 1-9からなる群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1-9からなる群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1-9からなる群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、および(d) SEQ ID NO: 1-9からなる群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの免疫抗原性断片から選択されたポリペプチドを製造する方法を提供する。製造方法は、(a) 組換えポリヌクレオチドを用いて形質転換した細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養する過程と、(b) そ

50

のように発現したポリペプチドを受容する過程とを有し、組換えポリヌクレオチドはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに機能的に結合したプロモーター配列を有する。

【0021】

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

10

【0022】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e) (a) ~ (d) のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。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。

【0023】

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

20

30

【0024】

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: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列、(b) SEQ ID NO: 10 - 18 を有する群から選択したポリヌクレオチド配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のポリヌクレオチド配列、(c) (a) に相補的なポリヌクレオチド配列、(d) (b) に相補的なポリヌクレオチド配列、または(e) (a) ~ (d) のRNA等価物を含む実質上単離されたポリヌクレオチドを提供する。検出方法は、(a) ポリメラーゼ連鎖反応増幅を用いて標的ポリヌクレオチドまたはその断片を増幅する過程と、(b) 標的ポリヌクレオチドまたはその断片の存在・不存在を検出し、該標的ポリヌクレオチドまたはその断片が存在する場合にはオプションでその量を検出する過程を含む。

40

【0025】

本発明は更に、有効量のポリペプチドと薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供し、有効量のポリペプチドは、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも90%の相同性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または(d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含む。一実施例で

50

は、SEQ ID NO: 1 - 9 からなる一群から選択されたアミノ酸配列を含む組成物を提供する。更に、本発明は、患者にこの組成物を投与することを含む、機能的 P P 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。

【0026】

本発明はまた、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのア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 10
ニング方法は、(a) ポリペプチドを有するサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアゴニスト活性を検出する過程とを含む。別法では、本発明は、この方法によって同定されたアゴニスト化合物と好適な医薬用賦形剤とを含む組成物を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的 P P 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。

【0027】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) SEQ ID NO: 1 - 9 を 20
有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドのアンタゴニストとしての有効性を確認するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを含むサンプルを化合物に曝す過程と、(b) サンプル中のアンタゴニスト活性を検出する過程とを含む。一実施態様で本発明は、この方法によって同定したアンタゴニスト化合物と薬剤として許容できる賦形剤とを含む成分を提供する。更なる別法では、本発明は、この組成物の患者への投与を含む、機能的 P P 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。

【0028】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 30
% の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の免疫抗原性断片を含むポリペプチドに特異結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドを適切な条件下で少なくとも 1 つの試験化合物に結合させる過程と、(b) 試験化合物とのポリペプチドの結合を検出し、それによってポリペプチドに特異結合する化合物を同定する過程とを含む。

【0029】

この方法は、(a) このポリペプチドを好適な条件下で少なくとも 1 つの化合物と結合させるステップと、(b) このポリペプチドとこの試験化合物との結合を検出して、このポリ 40
ペプチドと特異的に結合する化合物を同定するステップとを含む。

【0030】

本発明は更に、(a) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列、(b) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列と少なくとも 90 % の同一性を有する天然のアミノ酸配列、(c) SEQ ID NO: 1 - 9 を有する群から選択したアミノ酸配列の生物学的活性断片、または (d) SEQ ID NO: 1 - 9 を 50
有する群から選択したアミノ酸配列のポリペプチドの免疫抗原性断片からなる群から選択されたポリペプチドの活性を調節する化合物をスクリーニングする方法を提供する。スクリーニング方法は、(a) ポリペプチドの活性が許容された条件下で、ポリペプチドを少なくとも 1 つの試験化合物と混合させる過程と、(b) ポリペプチドの活性を試験化合

物の存在下で算定する過程と、(c)試験化合物の存在下でのポリペプチドの活性を試験化合物の不存在下でのポリペプチドの活性と比較する過程とを含み、試験化合物の存在下で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。

【0031】

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

10

【0032】

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

20

30

【0033】

(本発明の記載について)

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のではないことも併せて理解されたい。

40

【0034】

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。

【0035】

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

50

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。

【0036】

(定義)

用語「PP」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PPのアミノ酸配列を指す。

10

【0037】

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

【0038】

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

20

【0039】

PP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、PPと同じポリペプチド或いはPP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、PP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相当或いは予期しないハイブリダイゼーション、並びにPP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PP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PPの活性が保持される範囲で、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び/または両親媒性についての類似性に基づいて成され得る。例えば、負に帯電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸があり、正に帯電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンがある。親水性値が近似している非荷電極性側鎖を有するアミノ酸には、アスパラギンとグルタミン、セリンとスレオニンがある。親水性値が近似している非荷電側鎖を有するアミノ酸には、ロイシンとイソロイシンとバリン、グリシンとアラニン、フェニルアラニンとチロシンがある。

30

40

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

50

用語「アンタゴニスト」は、P Pの生物学的活性を阻害或いは減弱する分子である。アンタゴニストは、P Pに直接相互作用するか、或いはP Pが関与する生物学的経路の成分と作用して、P Pの活性を調節する抗体、核酸、糖質、小分子、任意の他の化合物や組成物などのタンパク質を含み得る。

【0043】

「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、無損傷免疫グロブリンやその断片、例えばF a、F (a b ') 2 及びF v断片を指す。P Pポリペプチドと結合する抗体は、免疫抗原として、そのままのポリペプチド、または関心のある小ペプチドを含む断片を用いて作製可能である。動物(マウス、ラット、ウサギ等)を免疫化するために用いるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳、または化学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、好みに応じて担体タンパク質に抱合することも可能である。通常用いられる担体であってペプチドと化学結合するものは、ウシ血清アルブミン、サイログロブリン及びスカイガイのヘモシアニン(K L H)等がある。結合ペプチドは、動物を免疫化するために用いる。

10

【0044】

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

20

【0045】

「アンチセンス」の語は、特定の核酸配列の「センス」(コーディング)鎖と塩基対を形成することが可能な任意の成分を指す。アンチセンス成分には、DNAや、RNAや、ペプチド核酸(PNA)や、ホスホロチオ酸、メチルホスホン酸またはベンジルホスホン酸等の修飾されたバックボーン連鎖を有するオリゴヌクレオチドや、2'-メトキシエチル糖または2'-メトキシエトキシ糖等の修飾された糖類を有するオリゴヌクレオチドや、或いは5-メチルシトシン、2-デオキシウラシルまたは7-デアザ-2'-デオキシグアノシン等の修飾された塩基を有するオリゴヌクレオチドが含まれうる。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」という表現は同センス鎖を意味することがある。

30

【0046】

「生物学的に活性」の語は、天然分子の構造的機能、調節機能または生化学的機能を有するタンパク質を指す。同様に、用語「免疫学的に活性」または「免疫原性」は、天然或いは組換え体のG C R E C、合成のP P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。

【0047】

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

40

【0048】

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

50

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。

【0049】

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

10

【0050】

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

元の残基	保存的な置換	
Ala	Gly, Ser	
Arg	His, Lys	
Asn	Asp, Gln, His	
Asp	Asn, Glu	
Cys	Ala, Ser	10
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	20
Met	Leu, Ile	
Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr	
Ser	Cys, Thr	
Thr	Ser, Val	
Trp	Phe, Tyr	
Tyr	His, Phe, Trp	30
Val	Ile, Leu, Thr	

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

【0051】

「欠失」は、結果的に1個若しくは数個のアミノ酸またはヌクレオチドが失われてなくなるようなアミノ酸またはヌクレオチド配列における変化を指す。 40

【0052】

「誘導体」の語は、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の化学修飾を指す。例えば、アルキル基、アシル基、ヒドロキシ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。 50

【0053】

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

【0054】

用語「断片」は、PPまたはPPをコードするポリヌクレオチドの固有の部分であって、その親配列（parent sequence）と同一であるがその配列より長さが短いものを指す。断片は、定義された配列の全長から1ヌクレオチド/アミノ酸残基を差し引いた長さよりも短い長さを有し得る。例えば或る断片は、5～1000の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有し得る。プローブ、プライマー、抗原、治療用分子として、或いはその他の目的のために用いられる断片は、少なくとも5、10、15、20、25、30、40、50、60、75、100、150、250若しくは500の連続したヌクレオチド或いはアミノ酸残基長さであり得る。断片は、分子の特定領域から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。

10

20

【0055】

SEQ ID NO: 10 - 18の断片は、例えば、この断片を得たゲノム内の他の配列とは異なる、SEQ ID NO: 10 - 18を明確に同定する固有のポリヌクレオチド配列の領域を含む。SEQ ID NO: 10 - 8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: 10 - 8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: 10 - 18の断片の正確な長さ及び断片に対応するID NO: 10 - 18の領域は、断片に対する意図した目的に基づき当業者が慣例的に決定することが可能である。

【0056】

SEQ ID NO: 1 - 9のある断片は、SEQ ID NO: 10 - 18の断片によってコードされる。SEQ ID NO: 1 - 9のある断片には、SEQ ID NO: 1 - 9を特異的に同定する固有のアミノ酸配列領域が含まれている。例えば、SEQ ID NO: 1 - 9のある断片は、SEQ ID NO: 1 - 9を特異的に認識する抗体の開発における免疫原性ペプチドとして有用である。SEQ ID NO: 1 - 9のある断片の正確な長さとその断片に対応するSEQ ID NO: 1 - 9での領域は、その断片の目的に基づいて当分野で一般的な技術によって日常的に決定できる。

30

【0057】

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

40

【0058】

「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。

【0059】

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

50

【0060】

ポリヌクレオチド配列間の一致率は、MEGALIGN version 3.12e 配列アラインメントプログラムに組込まれているようなCLUSTAL Vアルゴリズムのデフォルトのパラメータを用いて決定できる。このプログラムは、LASERGENE ソフトウェアパッケージ（一組の分子生物学的分析プログラム）(DNA STAR, 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。ポリペプチド配列を2つ1組でアラインメントする際のデフォルトパラメータは、Ktuple=2、gap penalty=5、window=4、「diagonal saved」=4と設定する。残基「重み付け」表をデフォルトとして選択する。CLUSTAL Vは、アラインメントされたポリヌクレオチド配列対間の「類似率」として一致率を報告する。 10

【0061】

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 20。BLASTソフトウェア一式には様々な配列分析プログラムが含まれており、既知のポリヌクレオチド配列を種々のデータベースから得た別のポリヌクレオチド配列とアラインメントする「blastn」もその1つである。その他にも、2つのヌクレオチド配列を対で直接比較するために用いる「BLAST 2 Sequences」と称されるツールも利用可能である。「BLAST 2 Sequences」は、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>にアクセスして対話形式で利用することが可能である。「BLAST 2 Sequences」ツールは、blastn と blastp (後述)の両方に用いることができる。BLASTプログラムは、一般的には、ギャップ及びデフォルト設定に設定された他のパラメータと共に用いる 30。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。

【0062】

Matrix: BLOSUM62

Reward for match: 11

Penalty for mismatch: -2

Open Gap: 5 及び Extension Gap: 2 penalties 40

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。

【0063】

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。

10

【0064】

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

【0065】

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

20

【0066】

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

30

【0067】

Matrix: BLOSUM62

Open Gap: 11 及び Extension Gap: 1 penalties

Gap x drop-off: 50

Expect: 10

Word Size: 3

Filter: on

40

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

50

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

【0068】

「ヒト人工染色体(HAC)」は、約6kb(キロベース)~10MbのサイズのDNA配列を含み得る、染色体の複製、分離及び維持に必要な全ての要素を含む直鎖状の小染色体である。

10

【0069】

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

【0070】

「ハイブリダイゼーション」は、所定のハイブリダイゼーション条件下で塩基対を形成することによって、一本鎖ポリヌクレオチドが相補的鎖とアニーリングするプロセスを指す。特異的ハイブリダイゼーションは、2つの核酸配列が高い相同性を共有することを示すものである。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、「洗浄」ステップ後もハイブリダイズされたままである。洗浄ステップは、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーを決定する際に特に重要であり、更にストリンジェントな条件では、非特異結合(即ち完全には一致しない核酸鎖間の対の結合)が減少する。核酸配列のアニーリングに対する許容条件は、本技術分野における当業者が慣例的に決定する。許容条件はハイブリダイゼーション実験の間は一定でよいが、洗浄条件は所望のストリンジェンシーを得るように、従ってハイブリダイゼーション特異性も得るように実験中に変更することができる。アニーリングが許容される条件は、例えば、温度が68℃で、約6×SSC、約1%(w/v)のSDS、並びに約100µg/mlのせん断して変性したサケ精子DNAが含まれる。

20

【0071】

一般に、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは或る程度、洗浄ステップを実行する温度を基準にして表すことができる。このような洗浄温度は通常、所定のイオン強度及びpHにおける特定の配列の融点(T_m)より約5~20℃低くなるように選択する。このT_mは、所定のイオン強度及びpHの下で、完全に一致するプローブに標的配列の50%がハイブリダイズする温度である。T_mを計算する式及び核酸のハイブリダイゼーション条件はよく知られており、Sambrook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。

30

本発明のポリヌクレオチド間の高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションでは、約0.2×SSC及び約1%のSDSの存在の下、約68℃で1時間の洗浄過程を含む。別法では、65℃、60℃、55℃、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。例えばRNAとDNAのハイブリダイゼーションのような特定条件下では、有機溶剤、例えば約35~50%v/vの濃度のホルムアミドを用いることもできる。洗浄条件の有用なバリエーションは、当業者には自明であろう。ハイブリダイゼーションは、特に高ストリンジェント条件下では、ヌクレオチド間の進化的な類似性を示唆し得る。このような類似性は、ヌクレオチド及びヌクレオチドにコードされるポリペプチドに対する類似の役割を強く示唆している。

40

50

【0072】

「ハイブリダイゼーション複合体」の語は、相補的塩基対間の水素結合の形成力によって2つの核酸配列間に形成された複合体を指す。ハイブリダイゼーション複合体は、溶解状態で形成し得る(C₀tまたはR₀t解析等)。或いは、一方の核酸配列が溶解状態で存在し、もう一方の核酸配列が固体支持体(例えば紙、膜、フィルタ、チップ、ピンまたはガラスライド、或いは他の適切な基質であって細胞若しくはその核酸が固定される基質)に固定されているような2つの核酸配列間に形成され得る。

【0073】

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

10

【0074】

「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。

【0075】

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

20

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

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

30

【0079】

「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。

【0080】

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

40

【0081】

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

50

【0082】

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

【0083】

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

10

【0084】

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。

20

【0085】

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

30

【0086】

プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの選択は、そのような目的のために本技術分野でよく知られているソフトウェアを用いて行う。例えばOLIGO 4.06ソフトウェアは、各100ヌクレオチドまでのPCRプライマー対の選択に有用であり、オリゴヌクレオチド及び最大5,000までの大きめのポリヌクレオチドであって32キロベースまでのインプットポリヌクレオチド配列から得たものを分析するのにも有用である。類似のプライマー選択プログラムには、拡張能力のための追加機能が組込まれている。例えば、PrimOUプライマー選択プログラム(テキサス州ダラスにあるテキサス大学南西部医療センターのゲノムセンターから一般向けに入手可能)は、メガベース配列から特定のプライマーを選択することが可能であり、従ってゲノム全体の範囲でプライマーを設計するのに有用である。Primer3プライマー選択プログラム(マサチューセッツ州ケンブリッジのWhitehead Institute/MITゲノム研究センターから一般向けに入手可能)ではユーザーが「ミスプライミング・ライブラリ」をインプットすることができ、ここでプライマー結合部位として避けたい配列はユーザーが指定する。Pr

40

50

i m e r 3 は特に、マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドの選択に有用である（後二者のプライマー選択プログラムのソースコードは、各自のソースから得てユーザー固有のニーズを満たすように変更してもよい）。Primer Gen プログラム（英国ケンブリッジ市の英国ヒトゲノムマッピングプロジェクト - リソースセンターから一般向けに入手可能）は、多数の配列アラインメントに基づいてプライマーを設計し、それによって、アラインメントされた核酸配列の最大保存領域または最小保存領域の何れかとハイブリダイズするようなプライマーの選択を可能にする。従って、このプログラムは、固有な、および保存されたオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片の同定に有用である。上記選択方法のいずれかによって同定したオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドの断片は、ハイブリダイゼーション技術において、例えば PCR または シー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。

【 0 0 8 7 】

「組換え核酸」は天然配列ではない配列であるか或いは人為的に組み合わせなければ分離しているような配列の 2 以上のセグメントを人為的に組み合わせで産出した配列を有する配列である。この人為的組合せはしばしば化学合成によって達成するが、より一般的には核酸の単離セグメントの人為的操作によって、例えばの S a m b r o o k らの文献（前出）に記載されているような遺伝子工学的的手法によって達成する。組換え核酸の語は、単に核酸の一部を付加、置換または欠失した変異核酸も含む。しばしば組換え核酸には、プロモーター配列に機能的に結合した核酸配列が含まれる。このような組換え核酸は、ベクターの不可欠なエレメントであって例えばある細胞を形質転換するために用いられるようなものであり得る。

【 0 0 8 8 】

或いはこのような組換え核酸は、ウイルスベクターの不可欠な要素であって例えばワクシニアウイルスに基づくものであり得る。ワクシニアウイルスは哺乳動物のワクチン接種に用いることが可能で、その際に組換え核酸が発現して哺乳動物の防御免疫応答を誘導する。

【 0 0 8 9 】

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

【 0 0 9 0 】

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

【 0 0 9 1 】

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

【 0 0 9 2 】

「サンプル」の語は、その最も広い意味で用いられる。PP、PP 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。

【 0 0 9 3 】

「特異結合」または「特異的に結合する」の語は、タンパク質またはペプチドと、アゴニスト、抗体、アンタゴニスト、小分子、任意の天然成分または合成結合成分との間の相互

作用を指す。この相互作用は、タンパク質の特定の構造（例えば抗原決定基即ちエピトープ）であって結合分子が認識するものが存在するか否かに依存している。例えば、抗体がエピトープ「A」に対して特異的である場合、標識された遊離したA及びその抗体を含む反応において、エピトープA（つまり遊離し、標識されていないA）を含むポリペプチドの存在が、抗体に結合している標識されたAの量を低減させる。

【0094】

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

10

【0095】

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

【0096】

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

【0097】

「転写イメージ」は、所与の時間、条件での固有の細胞タイプまたは組織による遺伝子発現の集合的パターンを指す。

20

【0098】

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

30

【0099】

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

40

【0100】

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.

50

9 (1999年5月7日)を用いてblastnを実行する。このような核酸対は、所定の長さに対して、例えば少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の相同性を示し得る。或る変異体は、例えば「対立遺伝子」変異体(前述)、「スプライス」変異体、「種」変異体または「多形性」変異体として説明し得る。スプライス変異体は参照分子とかなりの相同性を有し得るが、mRNAプロセッシング中のエキソンの異なるスライシングによって通常多数の或いは僅かな数のポリヌクレオチドを有することになる。対応するポリペプチドは、追加機能ドメインを有するか或いは参照分子に存在するドメインが欠落していることがある。種変異体は、種相互に異なるポリヌクレオチド配列である。結果的に生じるポリペプチドは通常、相互にかなりのアミノ酸相同性を有する。多形性変異体は、与えられた種の個体間で特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列が異なる。また、多形性変異体は、1つのヌクレオチド塩基によってポリヌクレオチド配列が変化する「単一ヌクレオチド多形性」(SNP)を含み得る。SNPの存在は、例えば特定の個体群、病状または病状性向を示し得る。

10

【0101】

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定義される。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。

20

【0102】

(発明)

本発明は、新規のヒトタンパク質ホスファターゼ(PP)及びPP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免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常の診断、治療、及び予防に関する。

【0103】

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ポリヌクレオチド配列番号(IncyteポリヌクレオチドID)によって表示した。

30

【0104】

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と2は発明したポリペプチドをポリペプチド配列識別番号(ポリペプチドSEQ ID NO)と対応する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。列3は、GenBankの最も近い相同体のGenBankの識別番号(Genbank ID NO:)を示す。列4は、各ポリペプチドとそのGenBank相同体との間の一致を表す確率スコアを示す。列5は、GwnBank相同体のアノテーションを示す。

40

【0105】

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と2は発明した個々のポリペプチドをポリペプチド配列識別番号(SEQ ID NO)と対応する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,

50

Madison WI)によって決定された、リン酸化およびグリコシル化の可能性のある部位を示す。列6は、シグネチャ(signature)配列、ドメイン、およびモチーフを含むアミノ酸残基を示す。列7は、タンパク質の構造/機能の分析のための分析方法を示し、該当箇所にはさらに分析方法に利用した検索可能なデータベースを示す。表2及び3は共に、本発明の各々のポリペプチドの特性を要約しており、それら特性が請求の範囲に記載されたポリペプチドがタンパク質ホスファターゼであることを確立している。例えば、SEQ ID NO: 1はシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)のプロテインホスファターゼ2C(GenBank ID g1945140)と38%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を参照)。BLAST確率スコアは $1.1e-30$ 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、プロテインホスファターゼ2C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を参照)。BLIMPS、MOTIFS、DOMO、及びPRODOMの解析よりのデータは、SEQ ID NO: 1がプロテインホスファターゼ2Cである、さらに実証的な証拠を提供する。

【0106】

例えば、SEQ ID NO: 3はヒトのチロシンホスファターゼ(GenBank ID g292376)と90%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を参照)。BLAST確率スコアは $7.3e-76$ である。SEQ ID NO: 3はまた、プロテインホスファターゼ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を参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILES CANの解析よりのデータは、SEQ ID NO: 3がプロテインホスファターゼである、さらに実証的な証拠を提供する。

【0107】

SEQ ID NO: 4はマウスのチロシンホスファターゼ(GenBank ID g2665458)と64%の同一性を有することがBLAST解析によって示された(表2を参照)。BLAST確率スコアは $3.8e-143$ である。SEQ ID NO: 4はまた、プロテインチロシンホスファターゼ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を参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILES CANの解析よりのデータは、SEQ ID NO: 4がプロテインチロシンホスファターゼである、さらに実証的な証拠を提供する(「プロテインチロシンホスファターゼ」は、主要な遺伝子ファミリーである「プロテインホスファターゼ」の内のある特定のサブファミリーであることに注意)。

【0108】

SEQ ID NO: 5はイネのセリントレオニンホスファターゼ(GenBank ID g5714762)と95%の同一性を有することがBLAST解析によって示された(表2を参照)。BLAST確率スコアは $1.1e-163$ である。SEQ ID NO: 5はまた、セリントレオニンプロテインホスファターゼ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を参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILES CANの解析よりのデータは、SEQ ID NO: 5がセリントレオニンホスファターゼである、さらに実証的な証拠を提供する。

【0109】

SEQ ID NO: 7はヒトの線条体に豊富なホスファターゼ(GenBank ID g 50

957217)と98%の同一性を有することがBLAST解析によって示された(表2を参照)。BLAST確率スコアは 1.4×10^{-294} である。SEQ ID NO: 7はまた、プロテインチロシンホスファターゼ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を参照)。BLIMPS、MOTIFS、及びPROFILESCANの解析よりのデータは、SEQ ID NO: 7がプロテインチロシンホスファターゼである、さらに実証的な証拠を提供する。

【0110】

SEQ ID NO: 8は分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)の4ニトロフェニルホスファターゼ(GenBank ID g3451473)と35%の同一性を有することがBLAST解析によって示された(表2を参照)。BLAST確率スコアは 7.0×10^{-41} である。SEQ ID NO: 8は、また、DOMOとPRODOMのデータベース中のニトロフェニルホスファターゼドメインと相同性をもっている(表3を参照)。

10

【0111】

SEQ ID NO: 9はヒトのFas関連のホスファターゼ-1(GenBank ID g7542482)と37%の同一性を有することがBLAST解析によって示された(表2を参照)。BLAST確率スコアは 4.1×10^{-36} である。SEQ ID NO: 9は、また、HMMER、BLIMPS、およびBLASTの分析によって示されるように、少なくとも1つのPDZドメインをもっている。PDZドメインは、Fas関連ホスファターゼ-1が関与するタンパク質とタンパク質との相互作用を仲介する(Irie, S. 他(1999) FEBS Lett. 460: 191-198)。SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 6は同様の方法で解析してアノテーションを付けた。SEQ ID NO: 1-9の解析のためのアルゴリズム及びパラメータが表7で記述されている。

20

【0112】

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ることで構築した。列1と2は本発明のポリヌクレオチドをポリヌクレオチド配列識別番号(Polynucleotide SEQ ID NO)と対応する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)を示す。列3は、各ポリヌクレオチド配列の長さ(塩基対単位)を示す。列4は、例えば、SEQ ID NO: 10-18を同定するため、或いはSEQ ID NO: 10-18と関連するポリヌクレオチド配列とを区別するためのハイブリダイゼーションまたは増幅技術に有用なポリヌクレオチド配列の断片を示す。列5はcDNA配列、ゲノムDNAから予想されたコード配列(エキソン)及び/またはcDNA及びゲノムDNAを共に有する配列集合に対応する識別番号を示している。これらの配列は、本発明の完全長ポリヌクレオチド配列を構築するのに用いた。表4の列6および列7はそれぞれ、列5の配列に対応するcDNA配列およびゲノム配列の開始ヌクレオチド(5')位置および終了ヌクレオチド(3')位置を示す。

30

40

【0113】

表4の列5の識別番号は、特に例えばIncyte cDNAとそれに対応するcDNAライブラリを意味する場合がある。例えば、8103438J1はIncyte cDNA配列の識別番号であり、MIXDIE02はそれが由来するcDNAライブラリの識別番号である。cDNAライブラリが示されていないIncyte cDNAは、プールされているcDNAライブラリ(例えば、70528419V1)に由来する。或いは列5の識別番号は、完全長ポリヌクレオチド配列の構築に寄与するGenBank cDNAまたはESTを意味する場合がある。或いは列5の識別番号は、ゲノムDNAのGenScan分析により予想されるコード領域を意味する場合がある。このGenScan推定コード配列は、配列を組み立てる前に編集する場合がある(実施例4を参照)。または

50

列5の識別番号は、「エキソンスティック(exon-stitching)」アルゴリズムにより集められた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(実施例5を参照)。または、列5の識別番号は、「エキソンスティック」アルゴリズムによって集められたcDNAおよびGenscan推定エキソンの両方からなる群の場合もある。例えば、FL7473604-g7329576_000027-g6692782は、「ストレッチ」された配列の識別場号であり、7473604はIncyteプロジェクト識別番号であり、g7329576は「エキソンスティック」アルゴリズムが適用されたヒト遺伝子配列のGenBank識別番号であり、g6692782は最も近いGenBankタンパク質相同体のGenBank識別番号である(実施例5を参照)。場合によっては、列5に示されている配列の範囲と重複するIncyte cDNAの範囲が得られ、最終的なコンセンサス配列が決定されるが、それに相当するIncyte cDNAの識別番号は示されていない。

10

【0114】

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。

【0115】

本発明はまた、PPの変異体も含む。好適なPPの変異体は、PP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PP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。

20

【0116】

本発明はまた、PPをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施例において、本発明は、PPをコードするSEQ ID NO: 10-18からなる一群から選択された配列を含むポリヌクレオチド配列を提供する。SEQ ID NO: 10-18のポリヌクレオチド配列は、配列表に示されているように等価RNA配列と同等の価値を有しているが、窒素塩基チミンの出現はウラシルに置換され、糖のバックボーンはデオキシリボースではなくシリボースから構成されている。

30

【0117】

本発明はまた、PP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、PPをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%のポリヌクレオチド配列同一性、或いは少なくとも85%のポリヌクレオチド配列同一性、更には少なくとも95%ものポリヌクレオチド配列同一性を有する。本発明の或る実施態様では、SEQ ID NO: 10-18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: 10-18からなる群から選択された配列を有するポリヌクレオチド配列の変異配列を含む。上記の任意のポリヌクレオチドの変異体は、PP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。

40

【0118】

遺伝暗号の縮重により作り出され得るPPをコードする種々のポリヌクレオチド配列には、既知の自然発生する任意の遺伝子のポリヌクレオチド配列と最小の類似性しか有しないものも含まれることを、当業者は理解するであろう。したがって本発明には、可能コドン選択に基づく組合せの選択によって産出し得るようなありとあらゆる可能性のあるポリヌクレオチド配列変異体を網羅し得る。これらの組み合わせは、天然のPPのポリヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号を基に作られ、全ての変異が明確に開示されていると考慮する。

【0119】

50

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

【0120】

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

更に本発明には、種々のストリンジエントな条件下で、請求項に記載されたポリヌクレオチド配列、特に、SEQ ID NO: 10 - 18及びそれらの断片とハイブリダイズ可能なポリヌクレオチド配列が含まれる(例えば、Wahl, G. M. 及びS. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 399 - 407; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152: 507 - 511)。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。

【0121】

DNAシーケンシングの方法は当分野でよく知られており、本発明の何れの実施例もDNAシーケンシング方法を用いて実施可能である。DNAシーケンシング方法には酵素を用いることができ、例えばDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、SEQUENASE (US Biochemical, Cleveland OH)、Taqポリメラーゼ (Applied Biosystems)、熱安定性T7ポリメラーゼ (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)を用いることができる。或いは、例えばELONGASE増幅システム (Life Technologies, Gaithersburg MD)において見られるように、ポリメラーゼと校正エキソヌクレアーゼを併用することができる。好適には、MICROLAB 2200液体転移システム (Hamilton, Reno, NV)、PTC 200サーマルサイクラー (MJ Research, Watertown MA)及びABI CATALYST 800サーマルサイクラー (Applied Biosystems)等の装置を用いて配列の調製を自動化する

次に、ABI 373 或いは 377 DNAシーケンシングシステム (Applied Biosystems)、MEGABACE 1000 DNAシーケンシングシステム (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA)または当分野でよく知られている他の方法を用いてシーケンシングを行う。結果として得られた配列を当分野でよく知られている種々のアルゴリズムを用いて分析する (Ausubel, F. M. (1997) Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 7.7ユニット、Meyers, R. A. (1995) Molecular Biology and Biotechnology, Wiley VCH, New York NY, 856 - 853ページ等を参照)。

【0122】

当分野で周知のPCR法をベースにした種々の方法で、部分的なヌクレオチド配列を利用して、PPをコードする核酸配列を伸長し、プロモーターや調節エレメントなどの上流にある配列を検出する。例えば、使用し得る方法の1つである制限部位PCR法は、ユニバ

10

20

30

40

50

ーサルプライマー及びネステッドプライマーを用いてクローニングベクター内のゲノムDNAから未知の配列を増幅する方法である (Sarkar, G. (1993) PCR Methods Applic. 2: 318-322)。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 (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増幅する方法に關与している (Lagerstrom, M. 他 (1991) PCR Methods Applic. 1: 1111-119を参照)。この方法では、PCRを行う前に複数の制限酵素の消化及び連結反応を用いて未知の配列領域内に組換え二本鎖配列を挿入することが可能である。また、未知の配列を検索するために用い得る別の方法については当分野で知られている (Parker, J. D. 他 (1991) Nucleic Acids Res. 19: 3055-3060を参照)。更に、PCR、ネステッドプライマー及びPromoter Finder (商標) ライブラリ (Clontech, Palo Alto CA) を用いてゲノムDNAをウォーキングすることができる。この手順は、ライブラリをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エキソン接合部を見付けるのに有用である。全てのPCRベースの方法に対して、市販されているソフトウェア、例えばOLIGO 4.06プライマー分析ソフトウェア (National Biosciences, Plymouth MN) 或いは別の好適なプログラムを用いて、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が約50%以上、温度約68~72で鋳型に対してアニーリングするようにプライマーを設計し得る。

【0123】

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。

【0124】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを用いて、シー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、放出された波長の検出に利用するCCDカメラとを有し得る。出力/光の強度は、適切なソフトウェア (Applied Biosystems社のGENOTYPER、SEQUENCE NAVIGATOR等) を用いて電気信号に変換し得る。サンプルのロードからコンピュータ分析及び電子データ表示までの全プロセスがコンピュータ制御可能である。キャピラリー電気泳動法は、特定のサンプルに少量しか存在しないようなDNA小断片のシークエンシングに特に適している。

【0125】

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

【0126】

種々の目的でPPをコードする配列を変えるために、当分野で一般的に知られている方法を用いて、本発明のヌクレオチド配列を組換えることができる。この目的には、遺伝子産物のクローン化、プロセッシング及び/または発現の調節が含まれるが、これらに限定されるものではない。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダムなフラグメンテ

ーション及びPCR再アセンブリによるDNAシャッフリングを用い、ヌクレオチド配列を組み換えることが可能である。例えば、オリゴヌクレオチド仲介特定部位突然変異誘導を利用して、新規な制限部位の生成、グリコシル化パターンの変更、コドン優先の変更、スプライス変異体の生成等を行う突然変異を導入し得る。

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

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

生物学的に活性なPPを発現させるために、PPをコードするヌクレオチド配列またはその誘導体を好適な発現ベクターに挿入する。この発現ベクターは、好適な宿主に挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳の調節に必要な要素を含む。これらの要素には、ベクター及びPPをコードするポリヌクレオチド配列におけるエンハンサー、構成型及び発現誘導型のプロモーター、5'及び3'の非翻訳領域などの調節配列が含まれる。このよう

な要素は、長さ及び特異性が様々である。特定の開始シグナルによって、PPをコードする配列のより効果的な翻訳を達成することが可能である。このようなシグナルには、ATG開始コドンと、コザック配列などの近傍の配列が含まれる。PP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. ら (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125 - 162. 等を参照)。

【0130】

当業者に周知の方法を用いて、PPをコードする配列、好適な転写及び翻訳調節エレメントを含む発現ベクターを作製することが可能である。これらの方法には、in vitro組換えDNA技術、合成技術、及びin vivo遺伝子組換え技術が含まれる (例えば、Sambrook, J. 他. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY, 4章及び8章, 及び16 - 17章; 及び Ausubel, F.M. 他. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York NY, 9章、13章及び16章を参照)。

【0131】

種々の発現ベクター/宿主系を利用して、PPをコードする配列の保持及び発現が可能である。限定するものではないがこのような発現ベクター/宿主系には、組換えバクテリオファージ、プラスミドまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌や、酵母菌発現ベクターで形質転換させた酵母菌や、ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) に感染した昆虫細胞系や、ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルスCaMVまたはタバコモザイクウイルスTMV) または細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR322プラスミド) で形質転換させた植物細胞系、動物細胞系などの微生物等がある (前出のSambrook、前出のAusubel、Van Heeke, G. and S.M. Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 5503 - 5509、; Engelhard, E.K. ら (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3224 - 3227、Sandig, V. ら (1996) *Hum. Gene Ther.* 7: 1937 - 1945、Takamatsu, N. (1987) *EMBOJ.* 6: 307 - 311、; 『マグローヒル科学技術年鑑』 (The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, 191 - 196ページ、Logan, J. and T. Shenk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3655 - 3659、Harrington, J.J. ら (1997) *Nat. Genet.* 15: 345 - 355 等を参照)。レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはワクシニアウイルス由来の発現ベクター、または種々の細菌性プラスミド由来の発現ベクターを用いて、ヌクレオチド配列を標的器官、組織または細胞集団へ輸送することができる (Di Nicola, M. 他 (1998) *Cancer Gen. Ther.* 5(6): 350 - 356、Yu, M. 他 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(13): 6340 - 6344、Buller, R.M. 他 (1985) *Nature* 317(6040): 813 - 815; McGregor, D.P. 他 (1994) *Mol. Immunol.* 31(3): 219 - 226、Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389: 239 - 242 等を参照)。本発明は使用される宿主細胞によって限定さ

れるものではない。

【0132】

本発明は使用される宿主細胞によって限定されるものではない。細菌系では、多数のクローニングベクター及び発現ベクターが、PP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、PPをコードするポリヌクレオチド配列の日常的なクローニング、サブクローニング、増殖には、PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla CA) または pSPORT1 プラスミド (GIBCO BRL) などの多機能の大腸菌ベクターを用いることができる。ベクターの多数のクローニング部位にPPをコードする配列をライゲーションすると lacZ 遺伝子が破壊され、組換え分子を含む形質転換された細菌の同定のための比色スクリーニング法が可能となる。更にこれらのベクターは、クローニングされた配列における *in vitro* 転写、ジデオキシのシーケンシング、ヘルパーファージによる一本鎖の救出、入れ子状態の欠失の生成にも有用であろう (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PPが必要な場合は、PPの発現をハイレベルで誘導するベクターが使用できる。例えば、強力な誘導T5バクテリオファージプロモーターまたは誘導T7バクテリオファージプロモーターを含むベクターが使用できる。

10

【0133】

PPの発現に酵母の発現系の使用が可能である。因子、アルコールオキシダーゼ、PGHプロモーター等の構成型或いは誘導型のプロモーターを含む多数のベクターが、発芽酵母菌 (*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. ら (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544、及び Scorer, C.A. ら (1994) Bio/Technology 12: 181-184. を参照)。

20

【0134】

植物系もPPの発現に使用可能である。PP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. ら (1984) EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie, R. ら (1984) Science 224: 838-843; および Winter, J. ら (1991) Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105 を参照)。これらの構成物は、直接DNA形質転換または病原体を媒介とする形質移入によって、植物細胞内に導入可能である (『マグローヒル科学技術年鑑』 (The McGraw Hill Yearbook of Science and Technology) (1992) McGraw Hill New York NY, pp. 191-196 等を参照)。

30

40

【0135】

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PP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PP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. Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 36553659 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

50

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。

【0136】

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

【0137】

哺乳動物系の組換えタンパク質の長期にわたる産生のためには、株化細胞における PP の安定した発現が望ましい。例えば、発現ベクターを用いて、PP をコードする配列を株化細胞に形質転換することが可能である。このような発現ベクターは、ウイルス起源の複製及び/または内在性の発現要素や、同じ或いは別のベクターの上の選択マーカー遺伝子を含む。ベクターの導入後、選択培地に移す前に強化培地で約 1 ~ 2 日間細胞を増殖させることができる。選択可能マーカーの目的は選択培地への抵抗性を与えることであり、選択可能マーカーが存在することにより、導入された配列をうまく発現するような細胞の成長及び回収が可能となる。安定的に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞型に適した組織培養技術を用いて増殖可能である。

任意の数の選択系を用いて、形質転換細胞株を回収できる。限定するものではないがこのような選択系には、tk^r 単純細胞のために用いられるヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子と、apr^r 細胞のために用いられるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子がある (例えば、Wigler, M. 他 (1977) Cell 11: 223 - 232; Lowy, I. 他 (1980) Cell 22: 817 - 823 を参照)。また、選択の基礎として代謝拮抗物質、抗生物質或いは除草剤への耐性を用いることができる。例えば dhfr はメトトレキセートに対する耐性を与え、neo はアミノグリコシッドネオマイシン及び G-418 に対する耐性を与え、als はクロルスルフロンに対する耐性を、pat はホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を各々与える (例えば、Wigler, M. 他 (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 35673570; Colbere Garapin, F. 他 (1981) J. Mol. Biol. 150: 1 - 14 を参照)。その他の選択可能な遺伝子、例えば、代謝のための細胞の必要条件を変える trpB 及び hisD は、文献に記載されている (Hartman, S. C. 及び R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047 - 8051 等を参照)。可視マーカー、例えばアントシアニン、緑色蛍光タンパク質 (GFP; Clontech)、グルクロニダーゼ及びその基質 グルクロニド、またはルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等を用いてもよい。これらのマーカーを用いて、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)。

【0138】

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

【0139】

一般に、PP をコードする核酸配列を含み且つ PP を発現する宿主細胞は、当業者によく知られている種々の方法を用いて同定することが可能である。限定するものではないが当業者によく知られている方法には、DNA-DNA 或いは DNA-RNA ハイブリダイゼーション、PCR 法、核酸或いはタンパク質の検出、定量、或いはその両方を行うための

10

20

30

40

50

膜系、溶液ベース或いはチップベースの技術を含むタンパク質の生物学的検定法または免疫学的検定法がある。

【0140】

特異的ポリクローナル抗体または特異的モノクローナル抗体を用いてPPの発現の検出及び計測を行うための免疫学的方法は、当分野で公知である。このような技術の例としては、酵素に結合した免疫吸着剤検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、フローサイトメーター(FACS)などが挙げられる。PP上の2つの非干渉エピトープに反応するモノクローナル抗体を用いた、2部位のモノクローナルベースイムノアッセイ(two-site, monoclonal-based immunoassay)が好ましいが、競合の結合アッセイも用いることもできる。これらのアッセイ及びこれ以外のアッセイは、当分野で公知である(Hampton, R. ら(1990) Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN, Sect. IV, Coligan, J. E. ら(1997) Current Protocols in Immunology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, New York NY, Pound, J. D. (1998) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa NJ等を参照)。

10

【0141】

多岐にわたる標識方法及び結合方法が、当業者に知られており、様々な核酸アッセイおよびアミノ酸アッセイにこれらの方法を用い得る。PP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、PPをコードする配列、またはその任意の断片をmRNAプローブを生成するためのベクターにクローニングすることも可能である。このようなベクターは、当分野において知られており、市販もされており、T7、T3またはSP6等の好適なRNAポリメラーゼ及び標識されたヌクレオチドを加えて、in vitroでRNAプローブの合成に用いることができる。このような方法は、例えばAmersham Pharmacia Biotech、Promega(Madison WI)、U.S. Biochemical等から市販されている種々のキットを用いて実行することができる。検出を容易にするために用い得る好適なレポーター分子或いは標識には、基質、補助因子、インヒビター、磁気粒子のほか、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、発色剤等がある。

20

30

【0142】

PP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。PP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PP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。

40

【0143】

更に、宿主細胞株の選択は、挿入した配列の発現を調節する能力または発現したタンパク質を所望の形に処理する能力によって行い得る。限定するものではないがこのようなポリペプチドの修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化及びアシル化がある。タンパク質の「プレプロ」または「プロ」形を切断するような翻訳後処理を利用して、タンパク質のターゲティング、折りたたみ及び/または活性を特定することも可能である。翻訳後の活性のための固有の細胞装置及び特徴のある機構を有する種々の宿主細胞(例えばCHO、HeLa、MDCK、MEK293、WI38等)は、American Type Culture Collection(ATCC, 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

50

するように選択し得る。

【0144】

本発明の別の実施例では、PPをコードする自然或いは変更された、または組換えの核酸配列を上記した任意の宿主系の融合タンパク質の翻訳となる異種配列に結合させる。例えば、市販の抗体によって認識できる異種部分を含むキメラPPタンパク質が、PP活性のインヒビターに対するペプチドライブラリのスクリーニングを促進し得る。また、異種タンパク質部分及び異種ペプチド部分も、市販されている親和性基質を用いて融合タンパク質の精製を促進し得る。限定されるものではないがこのような部分には、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオレドキシン(Trx)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、6-His、FLAG、c-myc、赤血球凝集素(HA)がある。GSTは固定化グルタチオン上で、MBPはマルトース上で、Trxはフェニルアルシンオキシド上で、CBPはカルモジュリン上で、そして6-Hisは金属キレート樹脂上で、同族の融合タンパク質の精製を可能にする。FLAG、c-myc及び赤血球凝集素(HA)は、これらのエピトープ標識を特異的に認識する市販されているモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いて、融合タンパク質の免疫親和性精製を可能にする。また、PPをコードする配列と異種タンパク質配列との間にあるタンパク質分解切断部位を融合タンパク質が含むように遺伝子操作すると、PPが精製の後に異種部分から切断され得る。融合タンパク質の発現及び精製方法は、前出のAusubel(1995)10章に記載されている。市販されている種々のキットを用いて融合タンパク質の発現及び精製を促進することもできる。

10

20

【0145】

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

【0146】

本発明のPPまたはその断片を用いて、PP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、PPへの特異的な結合をスクリーニングすることが可能である。試験化合物の例には、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば受容体)または小分子が挙げられる。

30

【0147】

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PP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に擬似のパートナーまたは自然に結合するパートナーに密接に関連している(Coligan, J. E. 他(1991) Current Protocols in Immunology 1(2)の5章等を参照)。同様に、化合物は、PP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PPを発現する好適な細胞の作製が含まれる。好適な細胞には、哺乳動物、酵母、ショウジョウバエ、大腸菌からの細胞が含まれる。PPを発現する細胞またはPPを含有する細胞膜断片を試験化合物と接触させて、PPまたは化合物の何れかの結合、刺激または阻害を分析する。

40

【0148】

あるアッセイは、単に試験化合物をポリペプチドに実験的に結合させ、結合を、蛍光色素、放射性同位体、酵素抱合体またはその他の検出可能な標識により検出することができる。例えば、このアッセイは、少なくとも1つの試験化合物を、溶液中の或いは固体支持物に固定されたPPと結合させるステップと、PP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

50

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。

【0149】

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

10

【0150】

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

20

30

【0151】

PP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*)。

【0152】

PP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「ロックイン」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。ロックイン技術を用いて、PP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PPを乳汁内に分泌するなどPP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*を参照)。

40

【0153】

(治療)

50

PPのある領域とタンパク質ホスファターゼの領域との間に、例えば配列及びモチーフの内容における化学的及び構造的類似性が存在する。更に、PPの発現は、心臓血管系組織、および脳組織に密接に関連する。従って、PPは、免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常においてある役割を果たすと考えられる。PPの発現若しくは活性の増大に関連する疾患の治療においては、PPの発現または活性を低下させることが望ましい。また、PP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、PPの発現または活性を増大させることが望ましい。

【0154】

従って、一実施例において、PP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PP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、このような疾患には免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常が含まれ、免疫系の疾患の中には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、X染色体連鎖ブルトン型低ガンマロブリン血症、分類不能型免疫不全(CVI)、ディジョージ症候群(胸腺形成不全症)、胸腺異型性、IgA単独欠損症、重症複合型免疫不全(SCID)、血小板減少および湿疹を伴う免疫不全症(ウイスコットアルドリッチ症候群)、チェジアック東症候群、慢性肉芽腫症、遺伝性血管神経性浮腫、クッシング病に関連した免疫不全症、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時性リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、腓炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、硬皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病(クールー、クロイツフェルトヤコブ病、ゲルストマン症候群、及びGerstmann-Straussler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫(cerebelloretinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病(気分性、不安性の障害、分裂病性疾患)、季節性障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトウレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミスマジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコーマリーツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Sydenham舞踏病(Sydenham's

c h o r e a) 及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病 (M C T D)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。

【 0 1 5 5 】

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 P P の発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、P P またはその断片や誘導体を発現し得るベクターを患者に投与することも可能である。 10

【 0 1 5 6 】

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

【 0 1 5 7 】

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 P P の発現または活性の低下に関連した疾患の治療または予防のために、P P の活性を調節するアゴニストを患者に投与することも可能である。 20

【 0 1 5 8 】

更なる実施例では、P P の発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、患者に P P のアンタゴニストを投与することが可能である。限定するものではないが、このような疾患の例には、上記した免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常が含まれる。一実施態様では、P P 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 P P を発現する細胞または組織に薬剤を運ぶターゲットイング或いは送達機構として間接的に用いられ得る。

【 0 1 5 9 】

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 P P の発現または活性の増大に関連した疾患の治療または予防のために、P P 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。 30

【 0 1 6 0 】

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

【 0 1 6 1 】

P P 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。 40
詳しくは、精製された P P を用いて抗体を作ったり、治療薬のライブラリをスクリーニングして P P と特異的に結合するものの同定が可能である。P P の抗体も、当分野で一般的な方法を用いて製造することが可能である。このような抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖、F a b 断片、及び F a b 発現ライブラリによって作られた断片が含まれる。但し、これらに限定されるものではない。中和抗体 (即ち二量体の形成を阻害する抗体) は通常、治療用に好適である。

【 0 1 6 2 】

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、P P 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 50

答を高めることもできる。限定するものではないがこのようなアジュバントには、フロイントアジュバントと、水酸化アルミニウム等のミネラルゲルアジュバントと、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール等の界面活性剤とがある。ヒトに用いられるアジュバントの中では、BCG（カルメット ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム パルヴムが特に好ましい。

【0163】

PPに対する抗体を誘発するために用いられるオリゴペプチド、ペプチド、または断片は、少なくとも約5個のアミノ酸からなり、一般的には約10個以上のアミノ酸からなるものが好ましい。これらのオリゴペプチド、ペプチドまたは断片は、天然のタンパク質のアミノ酸配列の一部と同一であり且つ小さな天然の分子の全アミノ酸配列を含むことが望ましい。PPアミノ酸の短いストレッチは、KLHなどの別のタンパク質の配列と融合し、キメラ分子に対する抗体が産生され得る。

10

【0164】

PP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)。

20

【0165】

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

30

【0166】

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

40

【0167】

PPに対する特異的な結合部位を含む抗体も得ることができる。例えば、限定するものではないが、このような断片には、抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')₂断片と、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって作製されるFab断片とがある。或いは、Fab発現ライブラリを作製することによって、モノクローナルFab断片を所望の特異性と迅速且つ容易に同定することが可能となる(Huse, W.D. 他(1989) Science 256:1275-1281等を参照)。

【0168】

50

種々のイムノアッセイを用いてスクリーニングし、所望の特異性を有する抗体を同定することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の何れかを用いる競合的な結合、または免疫放射線活性の検定のための数々のプロトコルが、当分野では周知である。通常このような免疫学的検定には、PPとその特異性抗体との間の複合体の計測が含まれる。二つの非干渉性PPエピトープに対して反応性のモノクローナル抗体を用いる、2部位モノクローナルベースのイムノアッセイが一般に利用されるが、競合的結合アッセイも利用することができる(Pound、前出)。

【0169】

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、PPに対する抗体の親和性を評価する。親和性を結合定数 K_a で表すが、この K_a は、平衡状態の下でPP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PPエピトープに対して親和性が不均一なポリクローナル抗体試薬の K_a は、PP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PPエピトープに単一特異的なモノクローナル抗体試薬の K_a は、親和性の真の測定値を表す。 K_a 値が $10^9 \sim 10^{12}$ liter/molの高親和性抗体試薬は、PP抗体複合体が激しい操作に耐えなければならないイムノアッセイに用いるのが好ましい。 K_a 値が $10^6 \sim 10^7$ liter/molの低親和性抗体試薬は、PPが抗体から最終的に活性化状態で解離する必要がある免疫精製(immunopurification)及び類似の処理に用いるのが好ましい(Catty, D. (1988) Antibodies, Volume I: A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC; Liddell, J. E. 及び Cryer, A. (1991) A Practical Guide to Monoclonal Antibodies, John Wiley & Sons, New York NY)。

10

20

30

40

50

【0170】

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 $1 \sim 2$ mg/mlの特異的な抗体、好ましくは $5 \sim 10$ mg/mlの特異的な抗体を含むポリクローナル抗体試薬は一般に、PP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らの文献等を参照)。

【0171】

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

【0172】

治療に用いる場合、アンチセンス配列を好適な標的細胞に導入するのに好適な任意の遺伝子送達系を用いることができる。アンチセンス配列は、転写時に標的タンパク質をコードする細胞配列の少なくとも一部に相補的な配列を発現する発現プラスミドの形で細胞内に輸送することが可能である(Slater, J. E. ら(1998) J. Allergy Clin. Immunol. 102(3): 469-475 及び Scanlon, K. J. ら(1995) 9(13): 1288-1296.等を参照)。アンチセンス配列はまた、例えばレトロウイルスやアデノ関連ウイルスベクター等のウイルスベクターを用いて細胞内に導入することもできる(Miller, A. D. (1990

) Blood 76:271、前出の Ausubel、Uckert, W. 及び 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系が含まれる (Rossi, J. J. (1995) Br. Med. Bull. 51(1):217-225; Boado, R. J. ら (1998) J. Pharm. Sci. 87(11):1308-1315、Morris, M. C. ら (1997) Nucleic Acids Res. 25(14):2730-2736. 等を参照)。

【0173】

本発明の別の実施例では、PPをコードするポリヌクレオチドを、体細胞若しくは生殖細胞の遺伝子治療に用いることが可能である。遺伝子治療を行うことにより、(i) 遺伝子欠損症 (例えばX染色体鎖遺伝 (Cavazzana-Calvo, M. 他 (2000) Science 288:669-672) により特徴付けられる重度の複合型免疫欠損症 (SCID) - X1の場合)、先天性アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に関連する重度の複合型免疫欠損症 (Blaese, R. M. 他 (1995) Science 270:475-480、Bordignon, C. 他 (1995) Science 270:470-475)、嚢胞性繊維症 (Zabner, J. 他 (1993) Cell 75:207-216; Crystal, R. G. 他 (1995) Hum. Gene Therapy 6:643-666、Crystal, R. G. 他 (1995) Hum. Gene Therapy 6:667-703)、サラセミア (thalassaemia)、家族性高コレステロール血症、第VIII因子若しくは第IX因子欠損に起因する血友病 (Crystal, R. G. (1995) Science 270:404-410、Verma, I. M. および Somia, N. (1997) Nature 389:239-242) を治療し、(ii) 条件的致死性遺伝子産物を発現させ (例えば制御不能な細胞増殖に起因する癌の場合)、(iii) 細胞内の寄生生物 (例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) (Baltimore, D. (1988) Nature 335:395-396、Poeschl, E. 他 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:11395-11399)、B型若しくはC型肝炎ウイルス (HBV、HCV)、Candida albicans 及び Paracoccidioides brasiliensis 等の真菌寄生菌、並びに熱帯熱マラリア原虫及びクルーズトリパノソーマ等の原虫寄生生物に対する防御機能を有するタンパク質を発現させることができる。PP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PP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。

【0174】

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

【0175】

PPの発現に影響を及ぼし得る発現ベクターには、限定するものではないが、PCDNA3.1、EPITAG、PRCCMV2、PREP、PVAXベクター (Invitrogen, Carlsbad CA)、PCMV-SCRIPT、PCMV-TAG、PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA)、PTET-O

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

【0176】

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。

【0177】

本発明の別の実施例では、PPの発現に関連する遺伝子欠損によって起こる疾患や異常症は、(i)レトロウイルス末端反復配列(LTR)プロモーター若しくは独立したプロモーターのコントロール下でPPをコードするポリヌクレオチドと、(ii)好適なRNAパッケージングシグナルと、(iii)追加のレトロウイルス・シス作用性RNA配列及び効率的なベクターの増殖に必要なコーディング配列を伴うRev応答性エレメント(RRE)とからなるレトロウイルスベクターを作製して治療することができる。レトロウイルスベクター(例えばPFB及びPFBNEO)はStratagene社から市販されており、刊行データ(Riviere, I. ら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6733-6737)に基づいている。上記データを引用することをもって本明細書の一部とする。ベクターは、好適なベクター産生細胞系(VPCL)において増殖され、VPCLは、標的細胞上の受容体に対する向性を有するエンベロープ遺伝子またはVSVg等の乱交雑エンベロープタンパク質を発現する(Armentano, D. ら (1987) J. Virol. 61:1647-1650、Bender, M.A. ら (1987) J. Virol. 61:1639-1646、Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806、Dull, T. ら (1998) J. Virol. 72:8463-8471、Zufferey, R. ら (1998) J. Virol. 72:9873-9880)。RIGGに付与された米国特許第5,910,434号(「Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant」)において、レトロウイルスパッケージング細胞系を得るための方法が開示されており、引用することをもって本明細書の一部とする。レトロウイルスベクターの増殖、細胞集団(例えばCD4⁺T細胞)の形質導入、及び形質導入した細胞の患者への戻しは、遺伝子

治療の分野では当業者に公知の方法であり、多数の文献に記載されている (Ranga, U. ら (1997) *J. Virol.* 71: 7020 - 7029、Bauer, G. ら (1997) *Blood* 89: 2259 - 2267、Bonyhadi, M. L. (1997) *J. Virol.* 71: 4707 - 4716、Ranga, U. ら (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 1201 - 1206、Su, L. (1997) *Blood* 89: 2283 - 2290)。

【0178】

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、PPの発現に関連する1或いは複数の遺伝子異常を有する細胞にPPをコードするポリヌクレオチドを送達する。アデノウイルス系ベクターの作製及びパッケージングについては、当業者に公知である。複製欠損型アデノウイルスベクターは、免疫調節タンパク質をコードする遺伝子を脾臓の無損傷の脾島内に導入するために可変性であることが証明された (Csete, M. E. ら (1995) *Transplantation* 27: 263 - 268)。使用できる可能性のあるアデノウイルスベクターは、Armentanoに付与された米国特許第5,707,618号(「Adenovirus vectors for gene therapy」)に記載されており、引用することをもって本明細書の一部とする。アデノウイルスベクターについては、Antinozzi, P. A. ら (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19: 511 - 544 及び Verma, I. M. and N. Somia (1997) *Nature* 18: 389: 239 - 242も参照されたい。両文献は、引用することをもって本明細書の一部とする。

10

20

【0179】

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

30

40

【0180】

別法では、ウイルス(正の一本鎖RNAウイルス)ベクターを用いてPPをコードするポリヌクレオチドを標的細胞に送達する。プロトタイプのウイルスであるセムリキ森林熱ウイルス(Semliki Forest Virus, SFV)の生物学的研究が広範に行われており、遺伝子導入ベクターがSFVゲノムに基づいていることが分かった (Garoff, H. および K. - J. Li (1998) *Cun. Opin. Biotech.* 9: 464 - 469)。ウイルスRNAの複製中に、通常はウイルスのキャプシッドタンパク質をコードするサブゲノムRNAが作り出される。このサブゲノム

50

RNAは、完全長のゲノムRNAより高いレベルに複製されるため、酵素活性（例えばプロテアーゼ及びポリメラーゼ）を有するウイルスタンパク質に比べてキャプシドタンパク質が過剰産生される。同様に、PPをコードする配列をウイルスゲノムのキャプシドをコードする領域に導入することによって、ベクター導入細胞において多数のPPをコードするRNAが産生され、高いレベルでPPが合成される。通常はウイルスの感染が数日以内での細胞溶解に関係する一方で、シンドビスウイルス（SIN）の変異体を有するハムスター正常腎臓細胞（BHK-21）の持続的な感染を確立する能力は、ウイルスの溶解複製を遺伝子治療に適用できるように好適に変更可能であることを示唆している（Dryga, S. A. 他（1997）*Viriology* 228 : 74 - 83）。様々な宿主にウイルスを導入できることから、様々なタイプの細胞にPPを導入することができる。或る集団におけるサブセットの細胞の特定形質導入は、形質導入前に細胞の選別を必要とし得る。ウイルスの感染性cDNAクローンの処置方法、ウイルスのcDNA及びRNAの形質移入方法及びウイルスの感染方法は、当業者に公知である。

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

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

【0184】

本発明の相補リボ核酸分子及びリボザイムは、核酸分子合成のために当分野でよく知られている任意の方法を用いて作製し得る。任意の方法には、固相フォスフォアミダイト化合物等のオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法がある。或いは、PP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。

【0185】

細胞内の安定性を高め、半減期を長くするためにRNA分子を修飾することができる。限

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

【0186】

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

【0187】

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。PPをコードするポリヌクレオチドを含むサンプルは、少なくとも1つの試験化合物に曝露して得る。サンプルには例えば、無傷細胞、透過処理した細胞、無細胞再構成系または再構成生化学系があり得る。PP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、PP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つ以上の試験化合物に曝露される及び曝露されないポリヌクレオチドの発現の比較に対する基礎を形成し得る。試験化合物に曝露されるポリヌクレオチドの発現における変化の検出は、ポリヌクレオチドの発現を変異する際に試験化合物が有効であることを示している。特異ポリヌクレオチドの変異発現に有効な化合物に対して、例えば分裂酵母 (*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) 。

【0188】

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*、*i*

10

20

30

40

50

n v i t r o及びe x v i v oの使用に対して同程度に適している。e x v i v o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)。

【0189】

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。

【0190】

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

【0191】

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

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

PPまたはその断片を含む高分子を直接細胞内に輸送するべく、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ボソーム製剤は、細胞融合及び高分子の細胞内送達を促進し得る。別法では、PPまたはその断片をHIV Tat-1タンパク質の陽イオンN末端部に結合することもできる。このようにして生成された融合タンパク質は、マウスモデル系の脳を含む全ての組織の細胞に形質導入することがわかっている (Schwarze, S. R. 他 (1999) Science 285: 1569 - 1572)。

【0195】

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

【0196】

医学的に効果的な薬用量は、症状や容態を回復させる、たとえばPPまたはその断片、PPの抗体、PPのアゴニストまたはアンタゴニスト、インヒビターなどの活性処方成分の量に関連する。治療有効度及び毒性は、細胞培養または動物実験における標準的な薬剤手

10

20

30

40

50

法によって、例えばED₅₀（集団の50%の医薬的有効量）またはLD₅₀（集団の50%の致死量）を測定するなどして決定することができる。毒性効果の薬用効果に対する投与量の比は、治療指数であり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。高い治療指数を示すような成分が望ましい。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータは、ヒトに用いるための投与量の範囲を調剤するのに用いられる。このような組成物が含まれる投与量は、毒性を殆ど或いは全く含まず、ED₅₀を含むような血中濃度の範囲にあることが好ましい。用いられる投与形態、患者の感受性及び投与の経路によって、投与量はこの範囲内で様々に変わる。

【0197】

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

10

【0198】

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。

20

【0199】

（診断）

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

30

【0200】

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

40

【0201】

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

【0202】

50

一実施形態では、PPまたは近縁の分子をコードする遺伝子配列を含むポリヌクレオチド配列を検出可能なPCRプローブを用いたハイブリダイゼーションによって、PPをコードする核酸配列を同定することが可能である。例えば5'調節領域である高度に特異的な領域か、例えば保存されたモチーフであるやや特異性の低い領域から作られているかのプローブの特異性と、ハイブリダイゼーション或いは増幅のストリンジェントは、プローブがPPをコードする自然界の配列のみを同定するかどうか、或いは対立遺伝子や関連配列をコードする自然界の配列のみを同定するかどうかによって決まるであろう。

【0203】

プローブはまた、関連する配列の検出に利用され、PPをコードする任意の配列と少なくとも50%の配列同一性を有し得る。目的の本発明のハイブリダイゼーションプローブには、DNAあるいはRNAが可能であり、SEQ ID NO: 10-18の配列、或いはPP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。

【0204】

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

【0205】

PPをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、PP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、このような疾患には免疫系の疾患、神経の疾患、発生または発達障害、および癌を含む細胞増殖異常が含まれ、免疫系の疾患の中には、後天性免疫不全症候群(AIDS)、X染色体連鎖ブルトン型低ガンマロブリン血症、分類不能型免疫不全(CVI)、ディジョージ症候群(胸腺形成不全症)、胸腺異型性、IgA単独欠損症、重症複合型免疫不全(SCID)、血小板減少および湿疹を伴う免疫不全症(ウスコットアルドリッチ症候群)、チェジアック東症候群、慢性肉芽腫症、遺伝性血管神経性浮腫、クッシング病に関連した免疫不全症、アジソン病、成人呼吸窮迫症候群、アレルギー、強直性脊椎炎、アミロイド症、貧血症、喘息、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性多腺性内分泌カンジダ性外胚葉ジストロフィ(APECED)、気管支炎、胆嚢炎、接触皮膚炎、クローン病、アトピー皮膚炎、皮膚筋炎、真性糖尿病、肺気腫、リンパ球毒素性一時的リンパ球減少症、胎児赤芽球症、結節性紅斑、萎縮性胃炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、痛風、グレーブス病、橋本甲状腺炎、過好酸球増加症、過敏性大腸症候群、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋または心膜炎、骨関節炎、骨粗しょう症、脾炎、乾癬、ライター症候群、慢性関節リウマチ炎、硬皮症、シェーグレン症候群、全身性アナフィラキシー、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、血小板減少症、潰瘍性大腸炎、ウェルナー症候群、癌合併症、血液透析、体外循環、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、寄生虫感染症、原虫感染症、蠕虫感染症、外傷が含まれ、神経の疾患の中には、癲癇、虚血性脳血管障害、脳卒中、大脳新生物、アルツハイマー病、ピック病、ハンチントン病、痴呆、パーキンソン病及びその他の錐体外路障害、筋萎縮性側索硬化及びその他の運動ニューロン障害、進行性神経性筋萎縮症、色素性網膜炎、遺伝性運動失調、多発性硬化症及び他の脱髄疾患、細菌性及びウイルス性髄膜炎、脳膿瘍、硬膜下蓄膿症、硬膜外膿瘍、化膿性頭蓋内血栓性静脈炎、脊髄炎及び神経根炎、ウイルス性中枢神経系疾患、プリオン病(クールー、クロイツフェルトヤコブ病、ゲルストマン症候群、及びGerstmann-Strausler-Scheinker症候群を含む)、致死性家族性不眠症、神経系性栄養病及び代謝病、神経線維腫症、結節硬化症、小脳網膜血管芽腫(cerebellor

10

20

30

40

50

retinal hemangioblastomatosis)、脳3叉神経血管症候群、ダウン症候群を含む中枢神経系性の精神薄弱及び他の発生障害、脳性麻痺、神経骨格異常症、自律神経系障害、脳神経障害、脊髄障害、筋ジストロフィー及びその他の神経筋障害、末梢神経疾患、皮膚筋炎及び多発性筋炎、遺伝性、代謝性、内分泌性、及び中毒性の筋疾患、重症筋無力症、周期性四肢麻痺、精神病(気分性、不安性の障害、分裂病性疾患)、季節性障害(SAD)、静座不能、健忘症、緊張病、糖尿病性ニューロパシー、錐体外路性終末欠陥症候群、ジストニー、分裂病性精神障害、帯状疱疹後神経痛、及びトゥレット病と、進行性核上麻痺、大脳皮質基底核部変性症、及び家族性の前頭側頭性健忘症とが含まれ、発生または発達障害の中には尿細管性アシドーシス、貧血、クッシング症候群、軟骨形成不全性小人症、デュシェンヌ ベッカー型筋ジストロフィー、癲癇、性腺形成異常、WAGR症候群(ウィルムス腫瘍、無虹彩症、尿生殖器異常、精神薄弱)、スミス マジェニス症候群(Smith-Magenis syndrome)、脊髄形成異常症候群、遺伝性粘膜上皮異形成、遺伝性角皮症、シャルコー マリー ツース病及び神経線維腫症などの遺伝性神経病、甲状腺機能低下症、水頭症、Syndenham 舞蹈病(Syndenham's chorea)及び脳性小児麻痺などの発作障害、脊髄二分裂、無脳症、頭蓋脊椎披裂、先天性緑内障、白内障、感覚神経性聴力損失が含まれ、細胞増殖異常の中には日光性角化症、動脈硬化、アテローム性動脈硬化、滑液包炎、硬変、肝炎、混合型結合組織病(MCTD)、骨髄線維症、発作性夜間ヘモグロビン尿症、真性多血症、乾癬、原発性血小板血症、並びに腺癌及び白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、及び奇形癌、具体的には、副腎、膀胱、骨、骨髄、脳、乳房、頸部、胆嚢、神経節、消化管、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、副甲状腺、陰茎、前立腺、唾液腺、皮膚、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮の癌が含まれる。MADをコードするポリヌクレオチド配列は、サザン法やノーザン法、ドットプロット法、或いはその他の膜系の技術、PCR法、ディップスティック(dipstick)、ピン(pin)、ELISA式アッセイ、及び変異PPの発現を検出するために患者から採取した体液或いは組織を利用するマイクロアレイに使用することが可能である。このような定性方法または定量方法は、当分野で公知である。

10

20

【0206】

ある実施態様では、PPをコードするヌクレオチド配列は、関連する疾患、特に上記した疾患を検出するアッセイにおいて有用であろう。PP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の下、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PP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。

30

【0207】

PP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の下、動物或いはヒトの何れかの正常な被験者から抽出された体液或いは細胞と、PPをコードする配列或いはその断片とを結合させることにより達成され得る。実質的に精製されたポリヌクレオチドを既知量用いて行った実験から得た値を正常な対象から得た値と比較することにより、標準ハイブリダイゼーションを定量することができる。このようにして得た標準値は、疾患の徴候を示す患者から得たサンプルから得た値と比較することができる。標準値からの偏差を用いて疾患の存在を確定する。

40

【0208】

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

50

ら数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示し得る。

【0209】

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。

【0210】

PP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PPをコードするポリヌクレオチドの断片、或いはPPをコードするポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドの断片を含み、最適な条件下、特定の遺伝子や条件を識別するために利用される。また、オリゴマーは、やや緩いストリンジェント条件下で、近縁のDNA或いはRNA配列の検出、定量、或いはその両方のため用いることが可能である。

【0211】

或る実施態様において、PP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（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）法がある。SSCPでは、PPをコードするポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でDNAを増幅する。DNAは例えば、病変組織または正常組織、生検サンプル、体液その他に由来し得る。DNA内のSNPは、一本鎖形状のPCR生成物の2次及び3次構造に差異を生じさせる。差異は非変性ゲル中でのゲル電気泳動法を用いて検出可能である。fSSCPでは、オリゴヌクレオチドプライマーを蛍光性に標識する。それによってDNAシーケンシング機などの高処理機器でアンプリマー（amplicon）の検出が可能になる。更に、インシリコSNP（*in silico* SNP, *is* SNP）と呼ばれる配列データベース分析法は、一般的なコンセンサス配列に配列されるような個々の重畳するDNA断片の配列を比較することにより、多形性を同定し得る。これらのコンピュータベースの方法は、DNAの実験室での調整及び統計モデル及びDNA配列クロマトグラムの自動分析を用いたシーケンシングのエラーに起因する配列の変異をフィルタリングして除去する。別の態様では、例えば高処理MASSARRAYシステム（Sequenom, Inc., San Diego CA）を用いた質量分析によりSNPを検出し、特徴付ける。

【0212】

PPの発現を定量するために用いられ得る方法には、ヌクレオチドの放射標識或いはビオチン標識、調節核酸の相互増幅（coamplification）、及び標準的な曲線に結果が加えられたものが含まれる（例えば、Melby, P.C.他（1993）J. Immunol. Methods, 159:235-44; Duplaa, C.他（1993）Anal. Biochem. 229-236を参照）。目的のオリゴマーが種々の希釈液中に存在し、分光光度法または比色反応によって定量が迅速になるような高処理フォーマットのアッセイを行うことによって、複数のサンプルの定量速度を加速することができる。

【0213】

更に別の実施例では、本明細書に記載した任意のポリヌクレオチド配列由来のオリゴヌクレオチドまたはより長い断片を、マイクロアレイにおけるエレメントとして用いることができる。多数の遺伝子の関連発現レベルを同時にモニターする転写イメージング技術にマイクロアレイを用いることが可能である。これについては、以下に記載する。マイクロアレイはまた、遺伝変異体、突然変異及び多形性の同定に用いることができる。この情報

を用いることで、遺伝子機能を決定し、疾患の遺伝的根拠を理解し、疾患を診断し、遺伝子発現の機能としての疾病の進行/後退をモニターし、疾病治療における薬剤の活性を開発及びモニターすることができる。特に、患者にとって最もふさわしく、有効的な治療法を選択するために、この情報を用いて患者の薬理ゲノムプロファイルを開発することができる。例えば、患者の薬理ゲノムプロファイルに基づき、患者に対して高度に有効的で副作用を殆ど示さない治療薬を選択することができる。

【0214】

別の実施例では、PP、PPの断片、PPに特異的な抗体をマイクロアレイ上のエレメントとして用いることができる。マイクロアレイを用いて、上記のようなタンパク質-タンパク質相互作用、薬剤-標的相互作用及び遺伝子発現プロファイルをモニターまたは測定

10

【0215】

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

20

【0216】

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。

【0217】

本発明のポリヌクレオチドの発現のプロファイルを作製する転写イメージはまた、工業的または天然の環境化合物の毒性試験のみならず、in vitroモデル系及び薬剤の前臨床評価に関連して使用し得る。全ての化合物は、作用及び毒性のメカニズムを暗示する、しばしば分子フィンガープリントまたは毒性サインと称されるような特徴的な遺伝子発現パターンを惹起する (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。自己の発現が任意の試験された化合物により変化しない遺伝子が同様に重要であっても、このような遺伝子の発現レベルを用いて残りの発現データを規準化する。規準化手順は、異なる化合物で処理した後の発現データの比較に有用である。毒性シグネチャの要素に遺伝子機能を割り当てるのが毒性メカニズムの解釈に役立つが、毒性の予測につながるシグネチャの統計的に一致させるのに遺伝子機能の知識は必要とされない (例えば2000年2月29日に National Institute of Environmental Health Sciencesより発行された Press Release 00-02を参照されたい。これについては <http://www.niehs.nih.gov/oc/news/toxchip.htm> で入手可能である)。従って、中毒学的スクリーニングの際

30

40

50

に毒性シグネチャを用いて、全ての発現した遺伝子配列を含めることは重要且つ望ましいことである。

【0218】

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

【0219】

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ァイルは、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ァイルは、特定の組織または細胞タイプのポリペプチドを分離及び分析することにより作成し得る。或る実施例では、1次元等電点電気泳動によりサンプルからタンパク質を分離し、2次元ドデシル硫酸ナトリウムスラブゲル電気泳動により分子量に応じて分離するような2次元ゲル電気泳動により分離が達成される(前出のSteiner および Anderson)。タンパク質は、通常クーマシーブルーまたはシルバーまたは蛍光染色などの物質を用いてゲルで染色することにより、分散した、独特な位置にある点としてゲル中で可視化される。各タンパク質スポットの光学密度は、通常サンプル中のタンパク質レベルに比例する。異なるサンプル、例えば試験化合物または治療薬で処理または非処理のいずれかの生物学的サンプルから得られるタンパク質スポットの光学密度を比較し、処理に関連するタンパク質スポット密度の変化を同定する。スポット内のタンパク質は、例えば化学的または酵素的切断とそれに続く質量分析を用いる標準的な方法を用いて部分的にシーケンシングする。スポット内のタンパク質の同一性は、その部分配列を、好適には少なくとも5個の連続するアミノ酸残基を、本発明のポリペプチド配列と比較することにより決定し得る。場合によっては、決定的なタンパク質同定のための更なる配列が得られる。

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

【0220】

プロテオームレベルでの毒性サインも中毒学的スクリーニングに有用であり、転写レベルでの毒性サインと並行に分析するべきである。或る組織の或るタンパク質に対しては、転写とタンパク質の存在量の相関が乏しいこともあるので(Anderson, N.L. および J. Seilhamer (1997) Electrophoresis 18:533-537)、転写イメージにはそれ程影響しないがタンパク質のプロファイルを変化させるような化合物の分析においてプロテオーム毒性サインは有用たり得る。更に、体液中での転写の分析はmRNA急速な分解により困難であるので、タンパク質のプロファイル作成はこのような場合により信頼でき、情報価値がある。

【0221】

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

10

20

30

40

50

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

【0222】

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

10

【0223】

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

20

【0224】

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

30

40

【0225】

蛍光原位置ハイブリッド形成法 (FISH) は、他の物理的及び遺伝地図データと関連し得る (Heinz-Ulrich, 他 (1995) 前出の Meyers, 965-968ページ等を参照)。遺伝地図データの例は、種々の科学雑誌あるいはOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) のウェブサイトに見ることができる。物理的な染色体地図上のPPをコードする遺伝子の位置と特定の疾患との相関性、或いは特定の疾患に対する素因が、このような疾患と関連するDNA領域

50

の決定に役立つため、更なる位置を決定するクローニングが行われる。

【0226】

確定した染色体マーカーを用いた結合分析等の物理的マッピング技術及び染色体標本原位ハイブリッド形成法を用いて、遺伝地図を拡張することができる。例えばマウスなど別の哺乳動物の染色体上に遺伝子を配置することにより、正確な染色体の遺伝子座がわかっていない場合でも関連するマーカーを明らかにし得る。この情報は、位置クローニングその他の遺伝子発見技術を用いて疾患遺伝子を探す研究者にとって価値がある。疾患または症候群が、血管拡張性失調症の11q22-23領域等、特定の遺伝子領域への遺伝的結合によって大まかに位置決めがなされると、該領域に対するいかなるマッピングも、更なる調査のための関連遺伝子或いは調節遺伝子を表すことができる (Gatti, R. A. 10
ら (1988) Nature 336: 577-580等を参照)。転座、反転等に起因する、健常者、保有者、感染者の三者間における染色体位置の相違を発見するために本発明のヌクレオチド配列を用いてもよい。

【0227】

本発明の別の実施例では、PP、その触媒作用断片或いは免疫原断片またはそのオリゴペプチドを、種々の任意の薬剤スクリーニング技術における化合物のライブラリのスクリーニングに用いることができる。薬剤スクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離しているか、固体支持物に固定されるか、細胞表面上に保持されるか、細胞内に位置することになろう。PPと検査する薬剤との結合による複合体の形成を測定してもよい。

【0228】

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

【0229】

別の実施例では、PPと結合可能な中和抗体がPP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、PP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。

【0230】

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

【0231】

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。

【0232】

前述した及び以下に記載する全ての特許出願、特許、刊行物、特に米国特許出願第60/212,447号、同第60/213,746号、同第60/215,210号、同第60/216,529号、同第60/218,080号、および同第60/220,117に言及することをもって本明細書の一部とする。

【0233】

(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

10

20

30

40

50

ものであり、表4の列5に列記した。ホモジナイズしてグアニジニウムイソチオシアネート溶液に溶解した組織もあり、また、ホモジナイズしてフェノールまたは好適な変性剤の混合液に溶解した組織もある。変性剤の混合液は、例えばフェノールとグアニジニウムイソチオシアネートの単相溶液であるTRIzol (Life Technologies) 等である。結果として得られた溶解物は、塩化セシウムクッション上で遠心分離するかクロロホルムで抽出した。イソプロパノールか、酢酸ナトリウムとエタノールか、いずれか一方、或いは別の方法を用いて、溶解物からRNAを沈殿させた。

【0234】

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

10

【0235】

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

20

30

【0236】

2 cDNAクローンの単離

UNIZAPベクターシステム(Stratagene)を用いた*in vivo*切除によって、或いは細胞溶解によって、実施例1のようにして得たプラスミドを宿主細胞から回収した。MagicまたはWIZARD Minipreps DNA精製システム(Promega)、AGTC Miniprep精製キット(Edge Biosystems, Gaithersburg MD)、QIAGEN社のQIAWELL 8 Plasmid、QIAWELL 8 Plus Plasmid及びQIAWELL 8 Ultra Plasmid 精製システム、R.E.A.L. Prep 96プラスミドキットの中から少なくとも1つを用いて、プラスミドを精製した。プラスミドは、沈殿させた後、0.1mlの蒸留水に再懸濁して、凍結乾燥して或いは凍結乾燥しないで4で保管した。

40

【0237】

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ブ

50

ラスミドDNAを増幅した(Rao, V. B. (1994) Anal. Biochem. 216: 1-14)。宿主細胞の溶解及び熱サイクリング過程は、単一反応混合液中で行った。サンプルを処理し、それを384穴プレート内で保管し、増幅したプラスミドDNAの濃度をPICOGREEN色素(Molecular Probes, Eugene OR)及びFluoroskan II蛍光スキャナ(Labsystems Oy, Helsinki, Finland)を用いて蛍光分析的に定量した。

【0238】

3 シークエンシング及び分析

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

【0239】

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

10

20

30

40

50

リペプチド配列を分析した。完全長ポリヌクレオチド配列はまた、MACDNASIS PROソフトウェア（日立ソフトウェアエンジニアリング，South San Francisco CA）及びLASERGENEソフトウェア（DNA STAR）を用いて分析した。ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列アラインメントは、アラインメントした配列と配列の一致率も計算するMEGALIGNマルチシークエンスアラインメントプログラム（DNA STAR）に組み込まれているようなCLUSTALアルゴリズムによって特定されるデフォルトパラメータを用いて生成する。

【0240】

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

10

【0241】

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

20

【0242】

4 ゲノムDNAからのコード配列の同定及び編集

推定上のタンパク質ホスファターゼは、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された。Genscanは、様々な生物からゲノムDNA配列を分析する汎用遺伝子同定プログラムである（Burge, C. および S. Karlin (1997) J. Mol. Biol. 268: 78-94 及び Burge, C. 及び S. Karlin (1998) Cuff. Opin. Struct. Biol. 8: 346-354 参照）。プログラムは予測エキソンを連結し、メチオニンから停止コドンに及ぶ構築されたcDNA配列を形成する。Genscanの出力は、ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のFASTAデータベースである。Genscanが一度に分析する配列の最大範囲は、30kbに設定した。これらのGenscan推定cDNA配列の内、どの配列がタンパク質ホスファタ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モデルにおいてタンパク質ホスファターゼについて問合せて分析した。ホスファターゼとしてアノテーションが付けられたIncyteのcDNA配列に対する相同性を基に、可能性のあるタンパク質ホスファターゼが同定された。こうして選択されたGenscan予測配列は、次にBLAST分析により公共データベースgbpri及びgbhtgと比較した。必要であれば、genpeptからヒットしたトップのBLASTと比較することによりGenscan予測配列を編集し、余分なまたは取り除かれたエキソンなどのGenscanにより予測された配列のエラーを修正する。BLAST分析はまた、任意のIncyte cDNAまたはGenscan予測配列の公共cDNA適用範囲の発見に用いられるので、転写の証拠を提供する。Incyte cDNA適用範囲が利用できる場合には、この情報を用いてGenscan予測配列を修正または確認した。完全長ポリヌクレオチド配列は、実施例3に記載された構築プロセスを用いて、Incyte cDNA配列及び/または公共のcDNA配列でGenscan予測コード配列を構築することにより得た。或いは、完全長ポリヌクレオチド配列は編集または非編集のGenscan予測コード配列に完全に由来する。

30

40

【0243】

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 (Stitched Sequence)

50

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成した。間隔全体の長さがクラスタ中の 2 以上の配列に存在するような配列を同定し、そのように同定された間隔は推移により等しいと考えられた。例えば、1 つの cDNA 及び 2 つのゲノム配列に間隔が存在する場合、3 つの間隔は全て等しいと考えられる。このプロセスは、無関係であるが連続したゲノム配列を cDNA 配列により結び合わせて架橋し得る。このようにして同定された区間を、親配列 (parent sequence) に沿って現われるようにステッチアルゴリズムで縫い合わせ、可能な最も長い配列および変異配列を作製する。1 種類の親配列に沿って発生した間隔と間隔との連鎖 (cDNA - cDNA またはゲノム配列 - ゲノム配列) は、親の種類を変える連鎖 (cDNA - ゲノム配列) に優先した。結果として得られるステッチ配列は、BLAST 分析により公共データベース genpept 及び gbpr i に翻訳されて比較された。Genscan により予測された不正確なエキソンは、genpept からヒットしたトップの BLAST と比較することにより修正した。必要な場合には、追加 cDNA 配列を用いるかゲノム DNA の検査により配列を更に伸長させた。

10

20

30

40

50

【0244】

ストレッチ配列 (Stretched Sequence)

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

【0245】

6 PP をコードするポリヌクレオチドの染色体マッピング

SEQ ID NO: 10 - 18 を構築するために用いた配列を、BLAST 及び Smith-Waterman アルゴリズムを用いて、Incyte LIFESEQ データベース及び公共のドメインデータベースの配列と比較した。SEQ ID NO: 10 - 18 と一致するこれらのデータベースの配列を、Phrap (表 7) などの構築アルゴリズムを使用して、連続及び重複した配列のクラスタに組み入れた。スタンフォード・ヒトゲノムセンター (SHGC)、ホワイトヘッド・ゲノム研究所 (WIGR)、Genethon 等の公的な情報源から入手可能な放射線ハイブリッド及び遺伝地図データを用いて、クラスタ化された配列が前もってマッピングされたかを測定した。マッピングされた配列がクラスタに含まれている結果、個々の配列番号を含めてそのクラスタの全配列が地図上の位置に割り当てられた。

【0246】

地図上の位置は、ヒト染色体の範囲または間隔として表される。センチモルガン間隔の地図上の位置は、染色体の p アームの末端に関連して測定する (センチモルガン (cM) は、染色体マーカー間の組換え頻度に基づく計測単位である。平均して、1 cM は、ヒト中

のDNAの1メガベース(Mb)にほぼ等しい。尤も、この値は、組換えのホットスポット及びコールドスポットに起因して広範囲に変化する)。cM距離は、配列が各クラスター内に含まれるような放射線ハイブリッドマーカーに対して境界を提供するようなGeneThonによってマッピングされた遺伝マーカーに基づく。NCBI「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。

【0247】

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Ausubel, F.M.ら, 4章及び16章等を参照)。

【0248】

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

【0249】

(BLASTスコア×配列一致率)

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

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

【0250】

或いは、PPをコードするポリヌクレオチド配列は、由来する組織に対して分析する。例えば或る完全長配列は、Incyte cDNA配列(実施例3を参照)と少なくとも一部は重畳するように構築される。各cDNA配列は、ヒト組織から作製されたcDNAライブラリに由来する。各ヒト組織は、心血管系、結合組織、消化系、胚構造、内分泌系、外分泌腺、女性生殖器、男性生殖器、生殖細胞、血液および免疫系、肺、筋骨格系、神経系、膵臓、呼吸器系、感覚器官、皮膚、顎口腔系、分類不能/混合、または尿管などの1つの生物/組織のカテゴリーに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。同様に、各ヒト組織は、以下の疾患/病状カテゴリー-即ち癌、細胞系、発達、炎症、神経性、外傷、心血管、鬱血、その他の1つに分類される。各カテゴリーのライブラリ数を数えて、全カテゴリーの総ライブラリ数で除する。得られるパーセンテージは、PPをコードするcDNAの疾患特異的な発現を反映する。

cDNA配列およびcDNAライブラリ/組織の情報は、LIFESEQ GOLD データベース (Incyte Genomics, Palo Alto CA) から得ることができる。

【0251】

8 PPをコードするポリヌクレオチドの伸長

完全長のポリヌクレオチド配列もまた、完全長分子の適切な断片から設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いて該断片を伸長させて作製した。一方のプライマーは既知の断片の5'伸長を開始するべく合成し、他方のプライマーは既知の断片の3'伸長を開始するべく合成した。開始プライマーの設計は、長さが約22~30ヌクレオチド、GC含有率が50%以上となり、約68~72の温度で標的配列にアニーリングするように、OLIGO 4.06ソフトウェア (National Biosciences) 或いは別の適切なプログラムを用いて、cDNAから設計した。ヘアピン構造及びプライマー-プライマー二量体を生ずるようなヌクレオチドの区間は全て回避した。

【0252】

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。

【0253】

高忠実度の増幅が、当業者によく知られている方法を利用したPCR法によって得られた。PCRは、PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research, Inc.) を用いて96穴プレート内で行った。反応混合液は、鑄型DNA及び200 nmolの各プライマー、 Mg^{2+} と $(NH_4)_2SO_4$ と -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秒間
ステップ3	60	で1分間
ステップ4	68	で2分間
ステップ5	ステップ2、3、及び4を20回繰り返す	
ステップ6	68	で5分間
ステップ7	4	で保存

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

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

各ウェルのDNA濃度は、1X TE及び0.5 µlの希釈していないPCR産物に溶解した100 µlのPICO GREEN定量試薬 (0.25 (v/v) PICO GREEN; Molecular Probes, Eugene OR) を不透明な蛍光光度計プレート (Coming Costar, Acton MA) の各ウェルに分配してDNAが試薬と結合できるようにして測定する。サンプルの蛍光を計測してDNAの濃度を定量するべくプレートをFluoroskan II (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) でスキャンした。反応混合物のアリコート5~10 µl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。

10

20

30

40

50

【0254】

伸長させたヌクレオチドは、脱塩及び濃縮して384穴プレートに移し、CviJIコレラウイルスエンドヌクラーゼ (Molecular Biology Research, Madison WI) を用いて消化し、pUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) への再連結反応前に音波処理またはせん断した。シヨットガン・シークエンシングのために、消化したヌクレオチドを低濃度 (0.6~0.8%) のアガロースゲル上で分離し、断片を切除し、寒天をAgar ACE (Promega) で消化した。伸長させたクローンをT4リガーゼ (New England Biolabs, Beverly MA) を用いてpUC 18ベクター (Amersham Pharmacia Biotech) に再連結し、Pfu DNAポリメラーゼ (Stratagene) で処理して制限部位の張出部 (overhang) を満たし、大腸菌細胞に形質移入した。形質移入した細胞を選択して抗生物質を含む培地に移し、それぞれのコロニーを切りとってLB/2Xカルベニシリン培養液の384ウェルプレートに37で一晚培養した。

【0255】

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秒間 | 20 |
| 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20回繰り返す | | |
| ステップ6 | 72 | で5分間 | |
| ステップ7 | 4 | で保存 | |

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。

【0256】

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

【0257】

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: 10-18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50 pmolと、[γ -³²P]アデノシン3リン酸 (Amersham Pharmacia Biotech) 250 μ Ciと、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (DuPont NEN, Boston MA) を混合することにより標識する。標識したオリゴヌクレオチドは、SEPHADEX G-25超細繊維分子サイズ排除デキストラン ビードカラム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて十分に精製する。Ase I、Bgl II、Eco RI、Pst I、Xba

1またはPvuII(DuPontNEN)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。

【0258】

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°C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、プロットを室温で順次洗浄する。オートラジオグラフィまたはそれに代わるイメージング手段を用いてハイブリダイゼーションパターンを視覚化し、比較する。

10

【0259】

10 マイクロアレイ

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

20

【0260】

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(DNA STAR)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。

30

【0261】

組織または細胞サンプルの調製

グアニジウムチオシアネート法を用いて組織サンプルから全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/ μ lのオリゴ(dT)プライマー(21mer)、1×第一鎖合成バッファー、0.03unit/ μ lのRNAアーゼ阻害因子、500 μ MのdATP、500 μ MのdGTP、500 μ MのdTTP、40 μ MのdCTP、40 μ M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、GEMBR IGH Tキット(Incyte)を用いてポリ(A)⁺RNA含有の25体積ml内で行う。特異的な対照ポリ(A)⁺RNAは、非コード酵母ゲノムDNAから in vitro

40

50

o 転写により合成する。各反応サンプル（1つはCy3、もう1つはCy5標識）は、2.5 mlの0.5 M水酸化ナトリウムで処理し、85 °Cで20分間インキュベートし、反応を停止させてRNAを分解させる。サンプルは、2つの連続するCHROMA SPIN 30ゲル濾過スピンカラム（CLONTECH Laboratories, Inc. (CLONTECH), Palo Alto CA)を用いて精製する。結合後、2つの反応サンプルは、1 mlのグリコーゲン（1 mg/ml）を用いて析出させたエタノール、60 mlの酢酸ナトリウム及び300 mlの100%エタノールである。サンプルは次に、Speed VAC (Savant Instruments Inc., Holbrook NY)を用いて乾燥して仕上げ、14 µlの5×SSC/0.2% SDS中で再懸濁する。

10

【0262】

マイクロアレイの調製

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

【0263】

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

20

【0264】

米国特許第5,807,522号に記載されている方法を用いて、コーティングしたガラス基板にアレイエレメントを付加する。この特許に引用することを以って本明細書の一部とする。平均濃度が100 ng/µlのアレイエレメントDNA 1 µlを高速ロボット装置により開口キャピラリープリントエレメントに充填する。装置はここで、スライド毎に約5 nlのアレイエレメントサンプルを加える。

30

【0265】

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

40

【0266】

ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応は、5×SSC, 0.2% SDSハイブリダイゼーション緩衝液中のCy3及びCy5標識したcDNA合成生成物を各0.2 µg含む9 µlのサンプル混合体を有する。サンプル混合体は、65 °Cまで5分間加熱し、マイクロアレイ表面上で等分して1.8 cm²のカバーガラスで覆う。アレイは、顕微鏡スライドより僅かに大きい空洞を有する防水チェンバーに移す。チェンバーのコーナーに140 µlの5×SSCを加えることにより、チェンバー内部を湿度100%に保持する。アレイを含むチェンバーは、60 °Cで約6.5時間インキュベートする。アレイは、第1洗浄緩衝液中（1×SSC, 0.1% SDS）において45 °Cで10分間洗浄し、第2洗浄緩衝液中（0

50

・1×SSC)において45 で10分間各々3度洗浄して乾燥させる。

【0267】

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Innova 70混合ガス10Wレーザ(Coherent, Inc., Santa Clara CA)を備えた顕微鏡で検出する。20×顕微鏡対物レンズ(Nikon, Inc., Melville NY)を用いて、アレイ上に励起レーザ光の焦点を当てる。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。

10

【0268】

2つの異なるスキャンのうち、混合ガスマルチラインレーザは2つの蛍光色素を連続的に励起する。発光された光は、波長に基づき分離され、2つの蛍光色素に対応する2つの光電子増倍管検出器(PMT R1477, Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater NJ)に送られる。アレイと光電子増倍管間に設置された好適なフィルターを用いて、シグナルをフィルターする。用いる蛍光色素の最大発光の波長は、Cy3では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。

20

【0269】

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

【0270】

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

30

【0271】

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。

40

【0272】

1.1 相補的ポリヌクレオチド

PP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PPの発現を低下させるため即ち阻害するために用いられる。約15~30塩基対を含むオリゴヌクレオチドの使用について記すが、これより小さな或いは大きな配列の断片の場合でも本質的に同じ方法を用いることができる。Oligo4.06ソフトウェア(National Biosciences)及びPPのコーディング配列を用いて、適切なオリゴヌク

50

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PPをコードする転写物に結合するのを阻害する。

【0273】

1.2 PPの発現

PP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PPが発現するために、抗生物質耐性及びcDNAの転写レベルを高める誘導性のプロモーターを含む好適なベクターにcDNAをサブクローニングする。このようなプロモーターには、lacオペレーター調節エレメントに関連するT5またはT7バクテリオファージプロモーター及びtrp-lac(tac)ハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定するものではない。組換えベクターを、BL21(DE3)等の好適な細菌宿主に形質転換する。抗生物質耐性をもつ細菌が、イソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で誘発されるとPPを発現する。真核細胞でのPPの発現は、昆虫細胞株または哺乳動物細胞株に一般にバキュロウイルスとして知られているAutographica californica核多角体病ウイルス(ACMNPV)を感染させて行う。バキュロウイルスの非必須ポリヘドリン遺伝子を、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、PPをコードするcDNAと置換する。ウイルスの感染力は維持され、強い多角体プロモーターによって高いレベルのcDNAの転写が行われる。組換えバキュロウイルスは、多くの場合はSpodoptera frugiperda(Sf9)昆虫細胞に感染に用いられるが、ヒト肝細胞の感染にも用いられることもある。後者の感染の場合は、バキュロウイルスの更なる遺伝的変更が必要になる(Engelhard, E. K.ら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3224-3227, Sandig, V.ら(1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.等を参照)。

【0274】

殆どの発現系では、PP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)。精製の後、GST部分を特定の操作部位でPPからタンパク質的に切断できる。FLAGは8アミノ酸のペプチドであり、市販されているモノクローナル及びポリクローナル抗FLAG抗体(Eastman Kodak)を用いて免疫親和性精製を可能にする。6ヒスチジン残基が連続して伸長した6-Hisは、金属キレート樹脂(QIAGEN)上での精製を可能にする。タンパク質の発現及び精製の方法は、前出のAusubel(1995)10章、16章に記載されている。これらの方法で精製したPPを直接用いて以下の実施例16、17、18、および19のアッセイを行うことができる。

【0275】

1.3 機能的アッセイ

PP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PP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。選り抜きのベクターには、pCMVSPORTプラスミド(Life Technologies)及びpCR3.1プラスミド(Invitrogen)が含まれ、どちらもサイトメガロウイルスプロモーターを有する。リボ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時的に形質移入する。更に、標識タンパク質をコードする配列を含む1~2µgのプラスミドを同時に形質移

10

20

30

40

50

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

10

【0276】

遺伝子発現におけるPPの影響は、PPをコードする配列とCD64またはCD64-GFPのどちらかが形質移入された高度に精製された細胞集団を用いて評価することができる。CD64またはCD64-GFPは、形質転換された細胞表面で発現し、ヒト免疫グロブリンG(IgG)の保存領域と結合する。形質転換された細胞と形質転換されない細胞とは、ヒトIgGがCD64に対する抗体のどちらかで被覆された磁気ビードを用いて分離することができる(DYNAL, Lake Success, NY)。mRNAは、当分野で周知の方法で細胞から精製することができる。PP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。

20

【0277】

14 PP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PP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。

30

【0278】

或いは、レーザGENEソフトウェア(DNA STAR)を用いてPP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。例えばC末端付近或いは隣接する親水性領域等の、適切なエピトープの選択については、当分野で公知である(前出のAusubel, 1995, 11章等を参照)。

【0279】

通常は、長さ約15残基のオリゴペプチドを、Fmocケミストリーを用いるABI 431A ペプチドシンセサイザ(Applied Biosystems)を用いて合成し、N-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を用いた反応によってKLH(Sigma-Aldrich, St. Louis MO)に結合させて、免疫抗原性を高める(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-KLM複合体を用いてウサギを免疫化する。得られた抗血清の抗ペプチド活性及び抗PP活性を検査するには、ペプチドまたはPP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。

40

【0280】

15 特異的抗体を用いる天然PPの精製

50

天然 P P 或いは組換え P P を、P P に特異的な抗体を用いるイムノアフィニティークロマトグラフィにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、CNBr-活性化 SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) のような活性化クロマトグラフィ用レジンと抗 P P 抗体とを共有結合させることにより形成する。結合後に、製造者の使用説明書に従って樹脂をブロックし、洗浄する。

【0281】

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

10

【0282】

16 P P と相互作用する分子の同定

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

【0283】

別法では、P P 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。

20

【0284】

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

30

【0285】

17 P P 活性の実証

P P 活性は、P - ニトロフェニルリン酸 (PNPP) の加水分解によって測定する。P P を、0.1% のメルカプトエタノールの存在下で、HEPES バッファー (pH 7.5) 中に PNPP と共に 37 で 60 分インキュベートする。この反応は 6 ml の 10 N NaOH を加えて止める (Diamond, R. H. 他 (1994) Mol. Cell. Biol. 14: 375262)。別法では、P P の酸性ホスファターゼ活性は、pH 4.5 の 0.1 M クエン酸ナトリウム、及び 50 μl の 40 mM 塩化ナトリウム中に P P を含む抽出液と 100 μl の 10 mM PNPP を 37 で 20 分インキュベートして実証する。この反応は 0.5 ml の 0.4 M グリシン / NaOH (pH 10.4) を加えて止める (Safitig, P. 他 (1997) J. Biol. Chem. 272: 1862818635)。PNPP の加水分解によって起こる 410 nm での光吸収の増加を分光光度計で測定する。このアッセイでは、光吸収の増加が P P の活性に比例する。

40

【0286】

別法では、P P 活性は、リン酸化したタンパク質基質から除去されたリン酸の量を測定して決定する。反応は、60 mM Tris (pH 7.6)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.1% -メルカプトエタノールおよび 10 μM 基質、適量の ^{32}P 標識したセリン / トレオニン / またはチロシンを含む最終容量 30 μl の 2 nM 或いは 4 nM の酵

50

素において行なう。反応は基質で開始し、30 で10~15分インキュベートする。0.6 M HCl、90 mM Na₄P₂O₇、および2 mM NaH₂PO₄中の4% (w/v) 活性化木炭450 μlで停止させ、次に12,000 × gで5分間遠心分離する。酸可溶性³²Piを液体シンチレーションカウンターで定量する(Sinclair, C. 他(1999) J. Biol. Chem. 274:23666-23672)。

【0287】

18 PPインヒビターの同定

実施例17のアッセイで説明したように、検査されるべき化合物を、好適なバッファーおよび基質と共に様々な濃度で384-ウェルプレートのウェルに注入する。PP活性はそれぞれのウェルについて測定し、PP活性を阻害するそれぞれの化合物の能力および容量反応動態(dose-response kinetics)を決定することができる。PP活性を促進する分子の同定にも、このアッセイを用いることができる。

10

【0288】

19 PP活性の同定

PPの「基質トラッピング(substrate-trapping)」アッセイは、PTPシグネチャ配列におけるある突然変異によって付与され得る基質親和性の上昇を利用する。このような突然変異を有するPPは、それらの基質と安定した複合体を形成し、このような複合体を生化学的に単離し得る。PPの触媒ドメインをコードするクローンのPTPシグネチャ配列におけるインバリアントな残基の特定部位の突然変異誘発を、当分野で周知の方法或いはBIO-RADが販売するMUTA-GENEキットなどの市販のキットを用いて行うことができる。大腸菌においてPP突然変異を発現するために、突然変異を含むDNA断片を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)-PP融合タンパク質或いはPPをコードする配列を有する発現ベクターの対応する野生型配列と交換する。PP突然変異体が大腸菌で発現され、それをクロマトグラフィーで精製する。

20

【0289】

発現ベクターを、10 cmのシャーレ1枚につき20 μgのCsCl-精製DNA、6 cmのシャーレ1枚につき8 μgのCsCl-精製DNAを用いたリン酸カルシウム仲介性トランスフェクションによってCOS1または293細胞に形質転換する。トランスフェクションから48時間経過した後に、細胞を100 ng/mlの上皮成長因子で刺激すると、チロシンキナーゼEGFRがCOS細胞に多量に存在するため、細胞におけるチロシンのリン酸化が増大する。細胞を、50 mM Tris HCl (pH 7.5) / 5 mM EDTA / 150 mM NaCl / 1% Triton X-100 / 5 mMヨード酢酸 / 10 mM リン酸ナトリウム / 10 mM NaF / 5 μg/mlロイペプチン / 5 μg/mlアプロチニン / 1 mM benzamideで溶解する(10 cmのシャーレ1枚につき1 ml、6 cmのシャーレ1枚につき0.5 ml)。PPを、好適な抗体で溶解物から免疫沈降させる。GST-PP融合タンパク質を、細胞溶解物1 mgにつきそれぞれ、グルタチオン-セファロース、4 μgのmAbまたは10 μlのビーズで沈降させる。複合体をPAGEで視覚化することができるが、更に精製して基質分子を同定することもできる(Flint, A. J. 他(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1680-1685)。

30

40

【0290】

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。

【0291】

(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

50

す。

【0292】

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

【0293】

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。

【0294】

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。

10

【0295】

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。

【0296】

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。

【0297】

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。

20

【表1】

表1

Incyte プロシ 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
8124196	1	8124196CD1	10	8124196CB1
7473604	2	7473604CD1	11	7473604CB1
1437588	3	1437588CD1	12	1437588CB1
7476861	4	7476861CD1	13	7476861CB1
5320695	5	5320695CD1	14	5320695CB1
8116710	6	8116710CD1	15	8116710CB1
5370008	7	5370008CD1	16	5370008CB1
3016191	8	3016191CD1	17	3016191CB1
7476860	9	7476860CD1	18	7476860CB1

10

20

30

40

表 2

ポリペプチド SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	GenBank ID NO:	確率スコア	GenBank 相同体
1	8124156CD1	g1945140	1.1e-30	ABI2プロテインホスファターゼ2C[シロイヌナズナ] Leung, J. 他 (1997) The Arabidopsis ABSICISIC ACID-INSENSITIVE (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. Plant Cell 9: 759-771.
2	7473604CD1	g6692782	6.7e-34	プロテインホスファターゼ[ヒト] Nakamura, K. 他 (1999) Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis. Biochem. J. 344:819-825.
3	1437588CD1	g292376	4e-81	プロテインチロシンホスファターゼ[ヒト] Rohan, P. J. 他 (1993) PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. Science 259:1763-1766
4	7476861CD1	g2665458	1e-155	プロテインチロシンホスファターゼ[ハツカネズミ] Cheung, M. 他 (1997) Molecular cloning and characterization of a novel cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase that is specifically expressed in spermatocytes. J. Biol. Chem. 272:33092-33099.
5	5320695CD1	g5714762	1e-178	セリン/トレオニンプロテインホスファターゼ PP2A-4 触媒サブユニット[イント型イネ]
6	8116710CD1	g452192	3.6e-32	プロテインチロシンホスファターゼ (PTP-BAS, type 2) [ヒト] Makiwara, K. 他 (1994) FEBS Lett. 10. 337:200-206)
7	5370008CD1	g957217	1.4e-294	線虫体に豊富に存在するホスファターゼ[ヒト]
8	3016191CD1	g3451473	7.0e-41	Li, X. 他 (1995) Genomics 28:442-449 4-ニトロフェニルホスファターゼ[分枝酵母 (Schizosaccharomyces pombe)]
9	7476860CD1	g7542482	4.1e-36	Fas 関連ホスファターゼ-1[ヒト]

10

20

30

40

表3-1

SEQ ID NO.	Incyte 株式会社 ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
1	8124196CD1	372	S41, S48, T140, S205, S263, S24580, T280, S368, T35	N338, N358	タンパク質ホスファターゼ2C マグネシウムドローゼマンガン多量塩化子族 PP2C アイソフォーム PD001101: E153-A276, Y274-N338, G96-E235, N255-V342 タンパク質ホスファターゼ2C DM00377P48597108-431: Y122-Q315, A322-N354 タンパク質ホスファターゼ2C モチーフ Pp2c: Y122-G130 タンパク質ホスファターゼ2C PP2C: R104-S339 タンパク質ホスファターゼ2C p BL01032: Y122-G131, N155-S172, S186-L195, S205-V244, H253-D266, T335-V344 膜貫通ドメイン: V152-R174	BLAST-PRODOM BLAST-DOMO MOTIFS HMMEP-PFAM BLIMPS-BLOCKS
2	7473604CD1	405	Y27, T91, T97, S136, T172, T231, T258, S280, S316, T351, S356, S362	N90, N183	膜貫通ドメイン: V152-R174 二重特異性ホスファターゼ、触媒ドメイン、DSPc: E50-K195 VHI タイプ二重特異性ホスファターゼ: DM03823 P28562 I69-314: E53-M197 二重特異性ホスファターゼ、触媒ドメイン、DSPc: G58-Q196 チロシンホスファターゼドメイン: V141-I154 プロテインチロシンホスファターゼ: PR00700D: R138-A156 チロシン特異性タンパク質ホスファターゼ: BL00383E: V141-A151 チロシン特異性タンパク質ホスファターゼ活性部位 (tyr_phosphatase.prf): A120-I180 VHI タイプ二重特異性ホスファターゼ: DM03823 P28562 I69-314: Q56-L198	HMMEP-TRANSMEMBRANE HMMEP-PFAM BLAST-DOMO HMMEP-PFAM MOTIFS BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-BLOCKS PROFILESAN BLAST-DOMO
3	1437588CD1	200	S161			

10

20

30

40

表 3-2

SEQ ID NO.	Incyte ポリブ ブチド ID	アミノ酸残 基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化 部位	シグネチャ配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデー タベース
4	7476861CDB	420	S120 S182 S197 S20 S234 S272 S3 S312 S34 S51 S57 S76 S95 S96 T115 T235 T39 T84 Y195	N18 N210 N246 N376	チロシン特異性タンパク質ホスファターゼ活性部位 tyr_phosphatase.prf:A340-M388 膜貫通トメイン transmem_domain: V362-F379 タンパク質-チロシンホスファターゼ Y_phosphataseN183-E411 Tyr_Phosphatase V351-F363 チロシン特異性タンパク質ホスファターゼタンパク質 BLO0383A: K186-V200, K206-I214, D238-S248, Q315-F327, V351-G361, R389-F404 タンパク質チロシンホスファターゼ シグネチャ PR00700A: D207-I214, Y225-E245, H311-A328, P348-Y366, F379-G394, M395-C405 タンパク質-チロシン-ホスファターゼ DM00089 A54971 2204- 2475E107-L416 DM00089 P23468 1623-1906:M164-L413 DM00089 P26045 632-904:I159-V412 DM00089 P34138 13-350:D207-L413 タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体型20EC3.1.3.48 ホス ホチロシンホスファターゼ PTPASE ヒドロラーゼ PDO97276: M1-N179 ヒドロラーゼホスファターゼタンパク質タンパク質チロシン 前駆体シ グナル チロシン 膜貫通 グリコプロテイン 受容体 PD000167/N183- E411 ヒドロラーゼホスファターゼタンパク質 タンパク質チロシンチロシン 前 駆体 シグナル 膜貫通 グリコプロテイン 受容体 PD000155:T326- K415, L286-S393	PROFILES CAN HMMER HMMER-PFAM MOTIFS BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-DOMO BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM

10

20

30

40

【表 5】

表 3-3

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
5	5320695CD1	313	S183 S205 S216 S278 T149 T305 Y156 Y84	N233	Ser/Thr タンパク質ホスファターゼ:L14-R298 セリン/トレオニン特異性タンパク質ホスファターゼタンパク質 BL00125A:P55-V91, BL00125B:S97-G142, BL00125C:A161-P207, BL00125A:G221-N275 セリン/トレオニンホスファターゼファミリーシグネチャ PR00114A:P55-T82, PR00114B:Y84-Y111, PR00114C:I117-Y141, PR00114D:D152-I178, PR00114E:L181-D208, PR00114F:N237-E257, PR00114G:K259-N275 セリン/トレオニン特異性タンパク質ホスファターゼシグネチャ: V98-N143	HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS PROFILES CAN BLAST-PRODOM
					ホスファターゼセリン/トレオニンヒドロラーゼ 鉄 マンガン サブユニット 多重置換子族 PD000252:L14-R299 セリン/トレオニンホスファターゼに類似 PD112269:E29-H113 ホスホプロテインホスファターゼ DM00133 S52659 11-307:L14-T308 DM00133 Q07098 4-300:G12-T308 DM00133 P23636 20-316:G12-T308 DM00133 P48577 4-300:L14-R307	BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
					Ser_Thr_Phosphatase: L118-E123	MOTIFS

10

20

30

40

【表 6】

表3-4

SEQ ID NO:	Incyte ポリバ チドID	アミノ酸残 基数	潜在的シシ酸化部位	潜在的グリコシル化 部位	シグネチン配列、 ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデー タベース
6	8116710GD1	622	S124 S189 S296 S320 S375 S382 S395 S436 S490 S510 S544 S605 S73 T211 T252 T406 T536 T538 T604 T613 Y182		バンド4.17アミノドメイン: BL00660D:F272-F295 バンド4.1タンパク質ファミリー PR00935A:L49-V61, PR00935C:L147-F167, PR00935D:E214-A230 細胞骨格構造的ホスファターゼヒドラーゼタンパク質 チロシリン 酸化モチーフチロシンバンド: PD000961:Y18-Y234 バンド4 DM00609 A54971 562-990:D14-K379 DM00609 F31976 1-405:W84-R367, K336-S382, D25-A88 DM00609 P26038 1-405:P106-R367, D25-I76 DM00609 P35241 1-406:W84-R367, D25-E87 膜貫通ドメイン:L122-L142	BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
7	5370008CD1	541	S160 S221 S244 S249 S28 S4 S417 S420 S434 S529 T144 T168 T209 T318 T355 T375 T59	N222 N91	膜貫通ドメイン: I468-I492 チロチンチロシホスファターゼ:L298-L530 チロチン特異性タンパク質ホスファターゼタンパク質 BL00383A:K301-V315, BL00383B:S327-I335, BL00383C:D358-T368, BL00383D:H429-P441, BL00383E:V470-G480, BL00383F:R508-F523, チロチンチロシホスファターゼシグネチン PR00700A:S328-I335, PR00700B:Y345-Q365, PR00700C:R425-D442, PR00700D:F467-T485, PR00700E:V498-G513, PR00700F:M514-V524 チロチン特異性タンパク質ホスファターゼ活性部位:L447-R608 Tyr_Phosphatase: V470-F482	HMMER HMMER HMMER-PFAM BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS PROFILES CAN MOTIFS

10

20

30

40

表3-6

SEQ ID NO:	Incyte ポリペプチド ID	アミノ酸残基数	潜在的リン酸化部位	潜在的グリコシル化部位	シグネチャ配列、ドメインおよびモチーフ	分析方法及びデータベース
9	7476860CD1	320	S219 S239 S296 S55 S59 S82 T204 T23 T284	N57	PDZ ドメイン(DHR、若しくは GLGF としても知られる): E90-P177 PDZ ドメイン: PF00595: I137-N147 GLGF ドメイン: DM00224 E54971 I1496-1590: V83-C175	HMMER-PFAM BLIMPS-PFAM BLAST-DMO

10

20

30

40

表4-1

ポリクレオチドSEQ ID NO.	Incyte ポリクレオチドID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
10	8124196CB1	1803	1-62, 1399-1803	70528419V1	1004	1803
				8103438J1 (MIXDDIE02)	491	1059
				3203544T6 (PENCNOT02)	427	977
				7667022H1 (TONSDIC01)	1	463
11	7473604CB1	1329	369-407, 1012-1329, 644-936	FL7473604-	1	897
				97329576_000027-96692782		
12	1437588CB1	1236	1-393	4456407F6 (HEADIR01)	835	1329
				1437588F6 (PANCNOT08)	74	604
				3973378H1 (ADRETUT06)	1	262
				441315H1 (MPHGNOT03)	1001	1236
				153239F6 (SPLANNOT04)	355	879
				4067805H1 (SEWVNOT05)	858	1152
13	7476861CB1	1914	647-748, 1-168, 1441-1808, 237-330, 1014-1144	5508091F6 (BRADDI01)	1385	1914
				70954791V1	815	1347
				71284965V1	473	1013
				70953936V1	1	629
				71285536V1	1158	1738
14	5320695CB1	1263		5914035F7 (BRAIFEN03)	474	1263
				71930652V1	1	644
15	8116710CB1	2278	1-78, 408-555, 941-1552	8037858H1 (SMCRUNE01)	1309	1946
				2899801F6 (DRGCNOT01)	903	1353
				8116710H1 (TONSDIC01)	435	1031
				70818281V1	1733	2278
				71225945V1	1518	2180
				6540118H1 (ADIPXTG1)	1089	1375
				6491034H1 (MIXDUNE01)	1	428
7408188H1 (UTREDE05)	383	1004				

10

20

30

40

表4-2

ポリヌクレオチドSEQ ID NO.	Incyte ポリヌクレオチド ID	配列長	選択された断片	配列断片	5'位置	3'位置
16	5370008CBI	2904	1-129, 1686-2532, 769-853	6442313HI (BRAENOT02)	2100	2746
				1287380F6 (BRAINOT11)	2175	2904
				7584530HI (BRAIFEC01)	553	1230
				71878587V1	1723	2399
				7178936HI (BRAXDIC01)	1	561
17	3016191CBI	1289	1-42, 1014-1289	71879372V1	1298	2029
				71880642V1	1133	1952
				7713736J2 (TESTTUR02)	421	1057
				FL3016191_98575852_000_002_96572215_1_1	1	507
				3016191F6 (MUSCNOT07)	549	1013
				6800702JI (COLENOT03)	204	786
				3379750HI (PENGNOT01)	957	1220
18	7476860CBI	1950	476-754, 398-420, 1913-1950, 1167-1226	946890HI (RATPNOT02)	1021	1289
				70880855V1	1432	1950
				5205306F6 (BRAFNOT02)	997	1603
				70880928V1	791	1437
				6746531HI (BRAFNOT02)	240	924
				6745671HI (BRAFNOT02)	27	642
				5681178HI (BRAENOT02)	1	242

10

20

30

40

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
10	8124196CE1	HEAONOC01
11	7473604CE1	HEAADIR01
12	1437588CE1	LEUKNOT03
13	7476861CE1	BRADDIR01
14	5320695CE1	BRAIFEN03
15	8116710CE1	MIXDUNE01
16	5370008CE1	BSCNCT03
17	3016191CE1	MUSCNOT07
18	7476860CE1	BRAFNO102

10

20

30

40

表6-1

ライブラリ	ベクター	ライブラリの説明
HEAONOC01	PSPORT1	ライブラリは、弾丸による負傷から死亡した39才の白人男性の大動脈から単離したRNAを用いて作製した。血清学はサイトメガロウイルス(GMV)にて陽性であった。患者の病歴には、タバコの乱用(25年間1日1箱)、そして陣こカイン、大麻、アルコールの使用が含まれる。
HEAADIR01	pINCY	ライブラリは、ポンペ病による心臓停止から死亡した7ヶ月の白人男子から採取した罹病右心室と心筋から単離したRNAを用いて作製した。患者の病歴には、ポンペ病、左心室肥大、発熱、完全右口管裂、口蓋裂、慢性シラ液性中耳炎、肥大型心筋性、鬱血性心不全、発育障害がある。家族歴には急性心筋梗塞、糖尿病、囊胞性線維症、ダウン症候群が含まれる。
LEUKNGT03	pINCY	ライブラリは血液型 A、Rh+の27歳の女性の白血球から単離したRNAを用いて作製した。提供者はサイトメガロウイルス(GMV)検査にて陰性であった。
BRADDIR01	pINCY	ライブラリは脳血管事故死亡の57才の白人男性の脳から除去した副脳の罹病神経叢から単離したRNAを用いて作製した。
BRALFEN03	pINCY	この標準化された胎児脳組織ライブラリは胎児脳組織ライブラリ326万の独立したクローンから作製した。RNA源は妊娠23週目で死産の左心低形成症胎児(白人男性)から採取した脳組織から作製した。このライブラリは、極めて長時間(48時間/一回)の再アニーリングによるハイブリダイゼーションを用いたことを除いては、Soares 他, PNAS (1994) 91:9228 および Bonaldo 他, Genome Research 6(1996):791 を適応した条件を用いて2回にわたリノーマライズした。

10

20

30

40

表6-2

ライブラリ	ペクター	ライブラリの説明
MIXDUR01	pINCY	ライブラリは、拡張法と種増殖を伴うランダム子宮抽出術を行った41歳の白人女性(提供者A)の子宮筋層と、57歳の白人男性の腎臓腫瘍から採取された非処理の平滑筋細胞から単離したRNAを用いて作製した。提供者Aの病理学検査では子宮筋層および頸部に特記するものはなかった。子宮内原は分泌性であり、子宮内腫瘍の断片が含まれていた。子宮頸内腹に良性の頸管内外粘膜炎が確認された。関連する腫瘍組織の病理学検査では、子宮平滑筋腫瘍が認められた。提供者Aの病歴には、非特異性生理不順、腹部ヘルニア、正常分娩、良性の卵巣腫瘍、およびタバコ中毒を含む。以前に提供者が受けた手術には両側卵管処分、単生卵巣の除去、及び診察間隔短縮がある。
BSCNNO03	pINCY	ライブラリは32歳の男性の脳から採取された星状細胞原線維腫性から単離したRNAを用いて作製した。病歴には放射線治療されたくつのかの小さな脳腫瘍が見られたが、老人斑や神経原線維腫性は見られなかった。患者の病歴には放射線治療された咽頭癌が含まれる。
BRAFNO02	pINCY	ライブラリは、心臓癌で死亡した35歳の白人男性から採取した上前頭葉神経から分離したRNAを使用して構築された。病理学検査では、中程度の軟膜線維腫と大脳新皮質の複数小体腫瘍が見られた。顕微鏡により、大脳半球は、焦点状浸潤がある中程度の軟膜線維腫と判明した。大脳半球全体に隔たらずに好発性の垂体ニューロンの形跡があった。さらに、大脳皮質全体に散在して、周辺神経膠性を伴う細胞数の小さな空洞発生があった。患者の病歴には、拡張型心筋症、鬱血性心不全、心臓肥大および脾臓と肝臓の肥大が見られた。
MUSCNO107	pINCY	ライブラリは、38歳白人女性の軟部組織切除術時に前腕から採取した筋肉組織から単離したRNAを用いて作成した。関連する腫瘍組織の病理学検査では、筋肉内血管腫が見られた。家族病歴には、乳癌、良性高血圧、脳血管疾患、結腸癌、及びII型糖尿病がある。

10

20

30

40

【表 1 4】

表7-1

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連値
ABI FACTURA	核酸配列においてベクター配列を除去して、不定の塩基をマスクするプログラム	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
ABI/PAPACEL FDF	Fast Data Finderは、アミノ酸または核酸配列の比較、注釈付けに有用である。	Applied Biosystems, Foster City, CA. Paracel Inc., Pasadena, CA.	不一致<50%
ABI オートアセンブ ラ	核酸配列を構築するプログラム。	Applied Biosystems, Foster City, CA.	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool はアミノ酸および核酸配列の配列類似性検索に有用であり、BLAST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) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.	ESTs 確率値=1.0E-8 以下 完全長配列: 確率値= 1.0E-10以下
FASTA	問合せ配列と同種の配列群配との類似性を検索する Pearson および Lipman アルゴリズム。FASTAは最低5つの機能からなる：fasta、ifasta、fastx、ifastx および 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; 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 fastx E 値=1.0E-8 以下 完全長配列: fastx スコア=100以上
BLIMPS	配列をBLOCKS、PRINTS、DOMO、PRODOM および PFAM データベースの配列と対応させて遺伝子アミノ、配列相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. and J.G. Henikoff (1991) Nucleic Acids Res.19:6565-6572; Henikoff, J.G. and S. Henikoff (1998) Methods Enzymol.266:88-105; および Attwood, T.K. 他。(1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	確率値= 1.0E-3以下
HMMER	PFAMのようなタンパク質ファミリーコンセンサス配列の隠れマルコフモデル(HMM)に基づいたデータベースに対して問合せ配列を検索するアルゴリズム。	Krogh, A. 他。(1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; Sonnhammer, E.L.L. 他 (1988) Nucleic Acids Res.26:320-322; Durbin, R. 他。(1998) Our World View, in a Nutshell, Cambridge Univ.Press, pp. 1-350.	PFAMヒット: 確率値=1.0E-3 以下 シグナルペプチドヒット: スコア=0以上

10

20

30

40

表7-2

プログラム	説明	引用文献	パラメータ関連値
ProfileScan	Prositeで定義された配列パターンと一致するタンパク質配列の構造的特徴的モチーフおよび配列モチーフを検索するアルゴリズム。	Gribskov, M. 他 (1988) CABIOS 4:61-66; Gribskov, M. 他 (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bairoch, A. 他. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	標準化された質のスコアとその特定のPrositeモチーフに対するOCG指定 "HIGH" 値 通常、スコア=1.4-2.1.
Phred	高い感度と精度で自動配列決定機のアナログのトレースを調べる塩基読み出しアルゴリズム。	Ewing, B. 他 (1998) Genome Res. 8:175-185; Ewing, B. and P. Green (1998) Genome Res. 8:186-194.	
Phrap	Smith-Waterman アルゴリズムの効率的なインプリメンテーションに基づくSWATやCrossMatchを含むPhils Revised Assembly プログラムで、配列相同性の検索やDNA配列の構築に有用である。	Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. および M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197; and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	スコア=120以上 一致した長さ=56以上
Consed	Phrap で構築したもの表示、編集用グラフィカルツール。	Gordon, D. 他 (1998) Genome Res. 8:195-202.	
SPScan	タンパク質配列をスキャンして、分泌シグナルペプチドの存在を調べる重み付けマトリックス解析プログラム。	Nielson, H. 他 (1997) Protein Engineering 10:1-6; Claverie, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	スコア=3.5以上
TMAP	加重マトリックスを用いて蛋白質配列での膜貫通セグメントの描写および配向を決定するプログラム。	Persson, B. および P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Persson, B. および P. Argos (1996) Protein Sci. 5:363-371.	
TMHMMER	隠れMarkov モデル(HMM)を使って蛋白質配列の膜貫通セグメントを描写し、配向を決定するプログラム。	Sonnhammer, E.L. 他 (1998) Proc Sixth Intl. Conf. on Intelligent Systems for Mol Biol. Glasgow 他, eds., The Am. Assoc. for Artificial Intelligence Press, Menlo Park, CA, pp. 175-182.	
Motifs	Prositeで定義された配列と一致したパターン/モチーフ配列を検索するプログラム。	Bairoch, A. 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221; Wisconsin Package Program Manual, 第9版, M51-59頁, Genetics Computer Group, Madison, WI	

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96546 A2

(51) International Patent Classification: C12N 9/00

(21) International Application Number: PCT/US01/19442

(22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/212,447	16 June 2000 (16.06.2000)	US
60/213,746	22 June 2000 (22.06.2000)	US
60/215,210	29 June 2000 (29.06.2000)	US
60/216,529	6 July 2000 (06.07.2000)	US
60/218,080	12 July 2000 (12.07.2000)	US
60/220,117	21 July 2000 (21.07.2000)	US

(US). RAMKUMAR, Jayalaxmi [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA 94555 (US). REDDY, Roopa [IN/US]; 1233 W. McKinley Avenue #3, Sunnyvale, CA 94086 (US). SANJANWALA, Madhu, S. [US/US]; 210 Sylvia Court, Los Altos, CA 94024 (US). STEWART, Elizabeth, A. [US/US]; 1767 Monticello Road, San Mateo, CA 94402 (US). TANG, Y., Tom [US/US]; 4230 Ranwick Court, San Jose, CA 95118 (US). THORNTON, Michael [US/US]; 9 Medway Road, Woodside, CA 94062 (US). TRIBOLEY, Catherine, M. [FR/US]; 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US). WALLIA, Narinder, K. [US/US]; 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). YANG, Junming [CN/US]; 7125 Bark Lane, San Jose, CA 95129 (US). YAO, Monique, G. [US/US]; 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US). YUE, Henry [US/US]; 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US).

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

(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AU-YOUNG, Janice [US/US]; 233 Golden Eagle Lane, Brisbane, CA 94005 (US). BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street #146, Palo Alto, CA 94306 (US). ELLIOTT, Vicki, S. [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue #1, Menlo Park, CA 94025 (US). GRIFFIN, Jennifer, A. [US/US]; 33691 Mello Way, Fremont, CA 94555 (US). HAFALIA, April [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA 95054 (US). KEARNEY, Liam [IE/US]; 50 Woodside Avenue, San Francisco, CA 94127 (US). LEE, Ernestine, A. [US/US]; 624 Kains Street, Albany, CA 94706 (US). LI, Yan [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (US). NGUYEN, Donnie, B. [US/US]; 1403 Ridgewood Drive, San Jose, CA 95118 (US). PATTERSON, Chandra [US/US]; 490 Sherwood Way #1, Menlo Park, CA 94025

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

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

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

WO 01/96546 A2

(54) Title: PROTEIN PHOSPHATASES

(57) Abstract: The invention provides human protein phosphatases (PP) and polynucleotides which identify and encode PP. 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 PP.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

PROTEIN PHOSPHATASES**TECHNICAL FIELD**

This invention relates to nucleic acid and amino acid sequences of protein phosphatases and to the use of these sequences in the diagnosis, treatment, and prevention of immune system disorders, neurological disorders, developmental disorders, and cell proliferative disorders, including cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of protein phosphatases.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Reversible protein phosphorylation is the ubiquitous strategy used to control many of the intracellular events in eukaryotic cells. It is estimated that more than ten percent of proteins active in a typical mammalian cell are phosphorylated. Kinases catalyze the transfer of high-energy phosphate groups from adenosine triphosphate (ATP) to target proteins on the hydroxyamino acid residues serine, threonine, or tyrosine. Phosphatases, in contrast, remove these phosphate groups. Extracellular signals including hormones, neurotransmitters, and growth and differentiation factors can activate kinases, which can occur as cell surface receptors or as the activator of the final effector protein, but can also occur along the signal transduction pathway. Cascades of kinases occur, as well as kinases sensitive to second messenger molecules. This system allows for the amplification of weak signals (low abundance growth factor molecules, for example), as well as the synthesis of many weak signals into an all-or-nothing response. Phosphatases, then, are essential in determining the extent of phosphorylation in the cell and, together with kinases, regulate key cellular processes such as metabolic enzyme activity, proliferation, cell growth and differentiation, cell adhesion, and cell cycle progression.

Protein phosphatases are generally characterized as either serine/threonine- or tyrosine-specific based on their preferred phospho-amino acid substrate. However, some phosphatases (DSPs, for dual specificity phosphatases) can act on phosphorylated tyrosine, serine, or threonine residues. The protein serine/threonine phosphatases (PSPs) are important regulators of many cAMP-mediated hormone responses in cells. Protein tyrosine phosphatases (PTPs) play a significant role in cell cycle and cell signaling processes. Another family of phosphatases is the acid phosphatase or histidine acid phosphatase (HAP) family whose members hydrolyze phosphate esters at acidic pH conditions.

PSPs are found in the cytosol, nucleus, and mitochondria and in association with cytoskeletal and membranous structures in most tissues, especially the brain. Some PSPs require divalent cations, such as Ca^{2+} or Mn^{2+} , for activity. PSPs play important roles in glycogen metabolism, muscle contraction, protein synthesis, T cell function, neuronal activity, oocyte maturation, and hepatic

WO 01/96546

PCT/US01/19442

metabolism (reviewed in Cohen, P. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58:453-508). PSPs can be separated into two classes. The PPP class includes PP1, PP2A, PP2B/calcineurin, PP4, PP5, PP6, and PP7. Members of this class are composed of a homologous catalytic subunit bearing a very highly conserved signature sequence, coupled with one or more regulatory subunits (PROSITE PDOC00115). Further interactions with scaffold and anchoring molecules determine the intracellular localization of PSPs and substrate specificity. The PPM class consists of several closely related isoforms of PP2C and is evolutionarily unrelated to the PPP class.

PP1 dephosphorylates many of the proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and is an important regulator of many cAMP-mediated hormone responses in cells. A number of isoforms have been identified, with the alpha and beta forms being produced by alternative splicing of the same gene. Both ubiquitous and tissue-specific targeting proteins for PP1 have been identified. In the brain, inhibition of PP1 activity by the dopamine and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein of 32kDa (DARPP-32) is necessary for normal dopamine response in neostriatal neurons (reviewed in Price, N.E. and M.C. Mumby (1999) *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:336-342). PP1, along with PP2A, has been shown to limit motility in microvascular endothelial cells, suggesting a role for PSPs in the inhibition of angiogenesis (Gabel, S. et al. (1999) *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121:463-468).

PP2A is the main serine/threonine phosphatase. The core PP2A enzyme consists of a single 36 kDa catalytic subunit (C) associated with a 65 kDa scaffold subunit (A), whose role is to recruit additional regulatory subunits (B). Three gene families encoding B subunits are known (PR55, PR61, and PR72), each of which contain multiple isoforms, and additional families may exist (Millward, T.A et al. (1999) *Trends Biosci.* 24:186-191). These "B-type" subunits are cell type- and tissue-specific and determine the substrate specificity, enzymatic activity, and subcellular localization of the holoenzyme. The PR55 family is highly conserved and bears a conserved motif (PROSITE PDOC00785). PR55 increases PP2A activity toward mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK kinase (MEK). PP2A dephosphorylates the MAPK active site, inhibiting the cell's entry into mitosis. Several proteins can compete with PR55 for PP2A core enzyme binding, including the CKII kinase catalytic subunit, polyomavirus middle and small T antigens, and SV40 small t antigen. Viruses may use this mechanism to commandeer PP2A and stimulate progression of the cell through the cell cycle (Pallas, D.C. et al. (1992) *J. Virol.* 66:886-893). Altered MAP kinase expression is also implicated in a variety of disease conditions including cancer, inflammation, immune disorders, and disorders affecting growth and development. PP2A, in fact, can dephosphorylate and modulate the activities of more than 30 protein kinases *in vitro*, and other evidence suggests that the same is true *in vivo* for such kinases as PKB, PKC, the calmodulin-dependent kinases, ERK family MAP kinases,

WO 01/96546

PCT/US01/19442

cyclin-dependent kinases, and the I κ B kinases (reviewed in Millward et al., supra). PP2A is itself a substrate for CKI and CKII kinases, and can be stimulated by polycationic macromolecules. A PP2A-like phosphatase is necessary to maintain the G1 phase destruction of mammalian cyclins A and B (Bastians, H. et al. (1999) Mol. Biol. Cell 10:3927-3941). PP2A is a major activity in the brain and is
5 implicated in regulating neurofilament stability and normal neural function, particularly the phosphorylation of the microtubule-associated protein tau. Hyperphosphorylation of tau has been proposed to lead to the neuronal degeneration seen in Alzheimer's disease (reviewed in Price and Mumby, supra).

PP2B, or calcineurin, is a Ca²⁺-activated dimeric phosphatase and is particularly abundant in
10 the brain. It consists of catalytic and regulatory subunits, and is activated by the binding of the calcium/calmodulin complex. Calcineurin is the target of the immunosuppressant drugs cyclosporine and FK506. Along with other cellular factors, these drugs interact with calcineurin and inhibit phosphatase activity. In T cells, this blocks the calcium dependent activation of the NF-AT family of transcription factors, leading to immunosuppression. This family is widely distributed, and it is likely
15 that calcineurin regulates gene expression in other tissues as well. In neurons, calcineurin modulates functions which range from the inhibition of neurotransmitter release to desensitization of postsynaptic NMDA-receptor coupled calcium channels to long term memory (reviewed in Price and Mumby, supra).

Other members of the PPP class have recently been identified (Cohen, P.T. (1997) Trends
20 Biochem. Sci. 22:245-251). One of them, PP5, contains regulatory domains with tetratricopeptide repeats. It can be activated by polyunsaturated fatty acids and anionic phospholipids *in vitro* and appears to be involved in a number of signaling pathways, including those controlled by atrial natriuretic peptide or steroid hormones (reviewed in Andreeva, A.V. and M.A. Kutuzov (1999) Cell Signal. 11:555-562).

PP2C is a ~42kDa monomer with broad substrate specificity and is dependent on divalent
25 cations (mainly Mn²⁺ or Mg²⁺) for its activity. PP2C proteins share a conserved N-terminal region with an invariant DGH motif, which contains an aspartate residue involved in cation binding (PROSITE PDOC00792). Targeting proteins and mechanisms regulating PP2C activity have not been identified. PP2C has been shown to inhibit the stress-responsive p38 and Jun kinase (JNK) pathways (Takekawa,
30 M. et al. (1998) EMBO J. 17:4744-4752).

In contrast to PSPs, tyrosine-specific phosphatases (PTPs) are generally monomeric proteins of very diverse size (from 20kDa to greater than 100kDa) and structure that function primarily in the transduction of signals across the plasma membrane. PTPs are categorized as either soluble phosphatases or transmembrane receptor proteins that contain a phosphatase domain. All PTPs share a

WO 01/96546

PCT/US01/19442

conserved catalytic domain of about 300 amino acids which contains the active site. The active site consensus sequence includes a cysteine residue which executes a nucleophilic attack on the phosphate moiety during catalysis (Neel, B.G. and N.K. Tonks (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:193-204). Receptor PTPs are made up of an N-terminal extracellular domain of variable length, a transmembrane region, and a cytoplasmic region that generally contains two copies of the catalytic domain. Although only the first copy seems to have enzymatic activity, the second copy apparently affects the substrate specificity of the first. The extracellular domains of some receptor PTPs contain fibronectin-like repeats, immunoglobulin-like domains, MAM domains (an extracellular motif likely to have an adhesive function), or carbonic anhydrase-like domains (PROSITE PDOC 00323). This wide variety of structural motifs accounts for the diversity in size and specificity of PTPs.

PTPs play important roles in biological processes such as cell adhesion, lymphocyte activation, and cell proliferation. PTPs μ and κ are involved in cell-cell contacts, perhaps regulating cadherin/catenin function. A number of PTPs affect cell spreading, focal adhesions, and cell motility, most of them via the integrin/tyrosine kinase signaling pathway (reviewed in Neel and Tonks, *supra*). CD45 phosphatases regulate signal transduction and lymphocyte activation (Ledbetter, J.A. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8628-8632). Soluble PTPs containing Src-homology-2 domains have been identified (SHPs), suggesting that these molecules might interact with receptor tyrosine kinases. SHP-1 regulates cytokine receptor signaling by controlling the Janus family PTKs in hematopoietic cells, as well as signaling by the T-cell receptor and c-Kit (reviewed in Neel and Tonks, *supra*). M-phase inducer phosphatase plays a key role in the induction of mitosis by dephosphorylating and activating the PTK CDC2, leading to cell division (Sadhu, K. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5139-5143). In addition, the genes encoding at least eight PTPs have been mapped to chromosomal regions that are translocated or rearranged in various neoplastic conditions, including lymphoma, small cell lung carcinoma, leukemia, adenocarcinoma, and neuroblastoma (reviewed in Charbonneau, H. and N.K. Tonks (1992) *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:463-493). The PTP enzyme active site comprises the consensus sequence of the MTM1 gene family. The MTM1 gene is responsible for X-linked recessive myotubular myopathy, a congenital muscle disorder that has been linked to Xq28 (Kioschis, P. et al., (1998) *Genomics* 54:256-266. Many PTKs are encoded by oncogenes, and it is well known that oncogenesis is often accompanied by increased tyrosine phosphorylation activity. It is therefore possible that PTPs may serve to prevent or reverse cell transformation and the growth of various cancers by controlling the levels of tyrosine phosphorylation in cells. This is supported by studies showing that overexpression of PTP can suppress transformation in cells and that specific inhibition of PTP can enhance cell transformation (Charbonneau and Tonks, *supra*).

Dual specificity phosphatases (DSPs) are structurally more similar to the PTPs than the PSPs.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

DSPs bear an extended PTP active site motif with an additional 7 amino acid residues. DSPs are primarily associated with cell proliferation and include the cell cycle regulators cdc25A, B, and C. The phosphatases DUSP1 and DUSP2 inactivate the MAPK family members ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), and p38 on both tyrosine and threonine residues (PROSITE PDOC 00323, *supra*). In the activated state, these kinases have been implicated in neuronal differentiation, proliferation, oncogenic transformation, platelet aggregation, and apoptosis. Thus, DSPs are necessary for proper regulation of these processes (Muda, M. et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:27205-27208). The tumor suppressor PTEN is a DSP that also shows lipid phosphatase activity. It seems to negatively regulate interactions with the extracellular matrix and maintains sensitivity to apoptosis. PTEN has been implicated in the prevention of angiogenesis (Giri, D. and M. Iltmann (1999) *Hum. Pathol.* 30:419-424) and abnormalities in its expression are associated with numerous cancers (reviewed in Tamura, M. et al. (1999) *J. Natl. Cancer Inst.* 91:1820-1828).

Histidine acid phosphatase (HAP; EXPASY EC 3.1.3.2), also known as acid phosphatase, hydrolyzes a wide spectrum of substrates including alkyl, aryl, and acyl orthophosphate monoesters and phosphorylated proteins at low pH. HAPs share two regions of conserved sequences, each centered around a histidine residue which is involved in catalytic activity. Members of the HAP family include lysosomal acid phosphatase (LAP) and prostatic acid phosphatase (PAP), both sensitive to inhibition by L-tartrate (PROSITE PDOC00538).

LAP, an orthophosphoric monoester of the endosomal/lysosomal compartment is a housekeeping gene whose enzymatic activity has been detected in all tissues examined (Geier, C. et al. (1989) *Eur. J. Biochem.* 183:611-616). LAP-deficient mice have progressive skeletal disorder and an increased disposition toward generalized seizures (Safitig, P. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:18628-18635). LAP-deficient patients were found to have the following clinical features: intermittent vomiting, hypotonia, lethargy, opisthotonos, terminal bleeding, seizures, and death in early infancy (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) *200950).

PAP, a prostate epithelium-specific differentiation antigen produced by the prostate gland, has been used to diagnose and stage prostate cancer. In prostate carcinomas, the enzymatic activity of PAP was shown to be decreased compared with normal or benign prostate hypertrophy cells (Foti, A.G. et al. (1977) *Cancer Res.* 37:4120-4124). Two forms of PAP have been identified, secreted and intracellular. Mature secreted PAP is detected in the seminal fluid and is active as a glycosylated homodimer with a molecular weight of approximately 100-kilodalton. Intracellular PAP is found to exhibit endogenous phosphotyrosyl protein phosphatase activity and is involved in regulating prostate cell growth (Meng, T.C. and M.F. Lin (1998) *J. Biol. Chem.* 273:22096-22104).

Synaptojanin, a polyphosphoinositide phosphatase, dephosphorylates phosphoinositides at

WO 01/96546

PCT/US01/19442

positions 3, 4 and 5 of the inositol ring. Synaptotagmin is a major presynaptic protein found at clathrin-coated endocytic intermediates in nerve terminals, and binds the clathrin coat-associated protein, EPS15, which is mediated by the C-terminal region of synaptotagmin-170, which has 3 Asp-Pro-Phe amino acid repeats. Further, this 3 residue repeat had been found to be the binding site for the EH domains of EPS15 (Haffner, C. et al. (1997) FEBS Lett. 419:175-180). Additionally, synaptotagmin may potentially regulate interactions of endocytic proteins with the plasma membrane, and be involved in synaptic vesicle recycling (Brodin, L. et al. (2000) Curr. Opin. Neurobiol. 10:312-320). Studies in mice with a targeted disruption in the synaptotagmin 1 gene (Synj1) were shown to support coat formation of endocytic vesicles more effectively than was seen in wild-type mice, suggesting that Synj1 can act as a negative regulator of membrane-coat protein interactions. These findings provide genetic evidence for a crucial role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling (Cremona, O. et al. (1999) Cell 99:179-188).

The discovery of new protein phosphatases 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 immune system disorders, neurological disorders, developmental disorders, and cell proliferative disorders, including cancer, and in the assessment of the effects of exogenous compounds on the expression of nucleic acid and amino acid sequences of protein phosphatases.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention features purified polypeptides, protein phosphatases, referred to collectively as "PP" and individually as "PP-1," "PP-2," "PP-3," "PP-4," "PP-5," "PP-6," "PP-7," "PP-8," and "PP-9." In one aspect, the invention provides an isolated polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a 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:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the invention provides an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1-9.

The invention further provides an isolated polynucleotide encoding a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a 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:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the

WO 01/96546

PCT/US01/19442

group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In one alternative, the polynucleotide encodes a polypeptide selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. In another alternative, the polynucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18.

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

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

25 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:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from the group
30 consisting of SEQ ID NO:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

The invention further provides an isolated polynucleotide selected from the group consisting of a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90%

WO 01/96546

PCT/US01/19442

identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). In one alternative, the polynucleotide comprises at least 60 contiguous nucleotides.

5 Additionally, the invention provides a method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide selected from the group consisting of
a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NO:10-18, b) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90%
10 identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, c) a
polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the
polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) hybridizing the
sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence
complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to
said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said
15 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)
20 polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID
NO:10-18, 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:10-18, c) a
polynucleotide complementary to the polynucleotide of a), d) a polynucleotide complementary to the
polynucleotide of b), and e) an RNA equivalent of a)-d). The method comprises a) amplifying said
25 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
30 the group consisting of SEQ ID NO:1-9, 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:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected
from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having
an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and a pharmaceutically

WO 01/96546

PCT/US01/19442

acceptable excipient. In one embodiment, the composition comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The invention additionally provides a method of treating a disease or condition associated with decreased expression of functional PP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

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

10 Additionally, the invention provides a method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a 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:1-9, c) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and d) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9. The method comprises a) exposing a sample comprising the polypeptide to a compound, and b) detecting 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 PP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition.

15 20 25 30 The invention further provides a method of screening for a compound that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, b) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 90% identical to an amino acid sequence selected from

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

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

The invention further provides a method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound; b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a polynucleotide having a sequence complementary to i), iv) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of ii), and v) an RNA equivalent of i)-iv). Hybridization occurs under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in

WO 01/96546

PCT/US01/19442

the biological sample, said target polynucleotide selected from the group consisting of i) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, ii) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 90% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18, iii) a polynucleotide complementary to the polynucleotide of i), iv) a polynucleotide complementary to the 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 score for the match between each polypeptide and its GenBank homolog is also shown.

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

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

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

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

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

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

An "allelic variant" is an alternative form of the gene encoding PP. 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 PP include those sequences with deletions, insertions, or substitutions of different nucleotides, resulting in a polypeptide the same as PP or a polypeptide with at least one functional characteristic of PP. Included within this definition are polymorphisms which may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe of

WO 01/96546

PCT/US01/19442

the polynucleotide encoding PP, and improper or unexpected hybridization to allelic variants, with a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding PP. 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 PP. 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 PP 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 PP. Antagonists may include proteins such as antibodies, nucleic acids, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of PP either by directly interacting with PP or by acting on components of the biological pathway in which PP 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 PP 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

5 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
10 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
15 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 PP, or of any oligopeptide thereof, to induce a specific immune response in appropriate animals or cells and to bind with specific antibodies.

20 "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.
25 Compositions comprising polynucleotide sequences encoding PP or fragments of PP 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
30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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
10	Ala	Gly, Ser
	Arg	His, Lys
	Asn	Asp, Gln, His
	Asp	Asn, Glu
	Cys	Ala, Ser
15	Gln	Asn, Glu, His
	Glu	Asp, Gln, His
	Gly	Ala
	His	Asn, Arg, Gln, Glu
	Ile	Leu, Val
20	Leu	Ile, Val
	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	His, Met, Leu, Trp, Tyr
	Ser	Cys, Thr
25	Thr	Ser, Val
	Trp	Phe, Tyr
	Tyr	His, Phe, Trp
	Val	Ile, Leu, Thr

30 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.

35 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.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

A "fragment" is a unique portion of PP or the polynucleotide encoding PP 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:10-18 comprises a region of unique polynucleotide sequence that specifically identifies SEQ ID NO:10-18, for example, as distinct from any other sequence in the genome from which the fragment was obtained. A fragment of SEQ ID NO:10-18 is useful, for example, in hybridization and amplification technologies and in analogous methods that distinguish SEQ ID NO:10-18 from related polynucleotide sequences. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:10-18 and the region of SEQ ID NO:10-18 to which the fragment corresponds are routinely determinable by one of ordinary skill in the art based on the intended purpose for the fragment.

A fragment of SEQ ID NO:1-9 is encoded by a fragment of SEQ ID NO:10-18. A fragment of SEQ ID NO:1-9 comprises a region of unique amino acid sequence that specifically identifies SEQ ID NO:1-9. For example, a fragment of SEQ ID NO:1-9 is useful as an immunogenic peptide for the development of antibodies that specifically recognize SEQ ID NO:1-9. The precise length of a fragment of SEQ ID NO:1-9 and the region of SEQ ID NO:1-9 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

5 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 3.12c 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:

15 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

20 <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

30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

*Gap x drop-off: 50**Expect: 10**Word Size: 11**Filter: on*

5 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
10 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
15 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,
20 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
25 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
30 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*

WO 01/96546

PCT/US01/19442

*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*

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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., C₀t or R₀t 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 PP 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 PP 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 PP. For example, modulation may

WO 01/96546

PCT/US01/19442

cause an increase or a decrease in protein activity, binding characteristics, or any other biological, functional, or immunological properties of PP.

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 PP 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 PP.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

5 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

10 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

15 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

20 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.

25 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

30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

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

A "regulatory element" refers to a nucleic acid sequence usually derived from untranslated regions of a gene and includes enhancers, promoters, introns, and 5' and 3' untranslated regions (UTRs).

10 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 radiolabels; enzymes; fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents; substrates; cofactors; inhibitors; magnetic particles; and other moieties known in the art.

15 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.

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

30 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.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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" 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

THE INVENTION

The invention is based on the discovery of new human protein phosphatases (PP), the polynucleotides encoding PP, and the use of these compositions for the diagnosis, treatment, or prevention of immune system disorders, neurological disorders, developmental disorders, and cell proliferative disorders, including cancer.

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

Table 2 shows sequences with homology to the polypeptides of the invention as identified by

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

5 Column 4 shows the probability score for the match between each polypeptide and its GenBank homolog. Column 5 shows the annotation of the GenBank homolog.

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

15 databases to which the analytical methods were applied.

Together, Tables 2 and 3 summarize the properties of each polypeptide of the invention, and these properties establish that the claimed polypeptides are protein phosphatases. For example, SEQ ID NO:1 is 38% identical to *Arabidopsis thaliana* protein phosphatase 2C (GenBank ID g1945140) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST

20 probability score is 1.1e-30, which indicates the probability of obtaining the observed polypeptide sequence alignment by chance. SEQ ID NO:1 also contains a protein phosphatase 2C domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, DOMO and PRODOM analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:1 is a protein

25 phosphatase 2C.

SEQ ID NO:3 is 90% identical to human tyrosine phosphatase (GenBank ID g292376) as determined by the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). (See Table 2.) The BLAST probability score is 7.3e-76. SEQ ID NO:3 also contains protein phosphatase domains as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM

30 database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:3 is a protein phosphatase.

SEQ ID NO:4 is 64% identical to murine protein-tyrosine phosphatase (GenBank ID g2665458) as determined by the BLAST analysis. (See Table 2.) The BLAST probability score is

WO 01/96546

PCT/US01/19442

3.8e-143. SEQ ID NO:4 also contains an protein-tyrosine phosphatase domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:4 is a protein-tyrosine phosphatase, note that "protein-tyrosine phosphatase" is a specific subfamily of the primary gene family, "protein phosphatases."

SEQ ID NO:5 is 95% identical to rice serine threonine phosphatase (GenBank ID g5714762) as determined by the BLAST analysis. (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.1e-163. SEQ ID NO:5 also contains a serine threonine protein phosphatase domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:5 is a serine threonine phosphatase.

SEQ ID NO:7 is 98% identical to human striatum-enriched phosphatase (GenBank ID g957217) as determined by the BLAST analysis. (See Table 2.) The BLAST probability score is 1.4e-294. SEQ ID NO:7 also contains a protein tyrosine phosphatase domain as determined by searching for statistically significant matches in the hidden Markov model (HMM)-based PFAM database of conserved protein family domains. (See Table 3.) Data from BLIMPS, MOTIFS, and PROFILESCAN analyses provide further corroborative evidence that SEQ ID NO:7 is a protein tyrosine phosphatase.

SEQ ID NO:8 is 35% identical to *Schizosaccharomyces pombe* 4-nitrophenylphosphatase (GenBank ID g3451473) as determined by the BLAST analysis. (See Table 2.) The BLAST probability score is 7.0e-41. SEQ ID NO:8 also has homology to nitrophenylphosphatase domains in the DOMO and PRODOM databases. (See Table 3.)

SEQ ID NO:9 is 37% identical to human Fas-associated phosphatase-1 (GenBank ID g7542482) as determined by the BLAST analysis. (See Table 2.) The BLAST probability score is 4.1e-36. SEQ ID NO:9 also contains at least one PDZ domain, as indicated by HMMER, BLIMPS, and BLAST analyses. PDZ domains mediate protein-protein interactions in which Fas-associated phosphatase-1 participates (Irie, S. et al. (1999) FEBS Lett. 460:191-198). SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:6 were analyzed and annotated in a similar manner. The algorithms and parameters for the analysis of SEQ ID NO:1-9 are described in Table 7.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Column 3 shows the length of each polynucleotide sequence in basepairs. Column 4 lists fragments of the polynucleotide sequences which are useful, for example, in hybridization or amplification technologies that identify SEQ ID NO:10-18 or that distinguish between SEQ ID NO:10-18 and related polynucleotide sequences. Column 5 shows identification numbers corresponding to cDNA sequences, coding sequences (exons) predicted from genomic DNA, and/or sequence assemblages comprised of both cDNA and genomic DNA. These sequences were used to assemble the full length polynucleotide sequences of the invention. Columns 6 and 7 of Table 4 show the nucleotide start (5') and stop (3') positions of the cDNA and/or genomic sequences in column 5 relative to their respective full length sequences.

10 The identification numbers in Column 5 of Table 4 may refer specifically, for example, to Incyte cDNAs along with their corresponding cDNA libraries. For example, 8103438J1 is the identification number of an Incyte cDNA sequence, and MIXDDIE02 is the cDNA library from which it is derived. Incyte cDNAs for which cDNA libraries are not indicated were derived from pooled cDNA libraries (e.g., 70528419V1). Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to
15 GenBank cDNAs or ESTs which contributed to the assembly of the full length polynucleotide sequences. Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to coding regions predicted by Genscan analysis of genomic DNA. The Genscan-predicted coding sequences may have been edited prior to assembly. (See Example IV.) Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon stitching"
20 algorithm. (See Example V.) Alternatively, the identification numbers in column 5 may refer to assemblages of both cDNA and Genscan-predicted exons brought together by an "exon-stretching" algorithm. For example, FL7473604-g7329576_000027-g6692782 is the identification number of a "stretched" sequence, with 7473604 being the Incyte project identification number, g7329576 being the GenBank identification number of the human genomic sequence to which the "exon-stretching"
25 algorithm was applied, and g6692782 being the GenBank identification number of the nearest GenBank protein homolog. (See Example V.) In some cases, Incyte cDNA coverage redundant with the sequence coverage shown in column 5 was obtained to confirm the final consensus polynucleotide sequence, but the relevant Incyte cDNA identification numbers are not shown.

Table 5 shows the representative cDNA libraries for those full length polynucleotide sequences
30 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 PP variants. A preferred PP variant is one which has at least

WO 01/96546

PCT/US01/19442

about 80%, or alternatively at least about 90%, or even at least about 95% amino acid sequence identity to the PP amino acid sequence, and which contains at least one functional or structural characteristic of PP.

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

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

It will be appreciated by those skilled in the art that as a result of the degeneracy of the genetic
20 code, a multitude of polynucleotide sequences encoding PP, 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
25 occurring PP, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode PP and its variants are generally capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring PP under appropriately selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding PP or its derivatives possessing a substantially different codon usage, e.g., inclusion of non-naturally occurring
30 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 PP 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

the naturally occurring sequence.

The invention also encompasses production of DNA sequences which encode PP and PP 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 PP or any fragment thereof.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

5 The nucleotides of the present invention may be subjected to DNA shuffling techniques such as MOLECULARBREEDING (Maxygen Inc., Santa Clara CA; described in U.S. Patent Number 5,837,458; Chang, C.-C. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:793-797; Christians, F.C. et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:259-264; and Cramer, A. et al. (1996) *Nat. Biotechnol.* 14:315-319) to alter or improve the biological properties of PP, such as its biological or enzymatic activity or its ability to
10 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"
15 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
20 manner.

In another embodiment, sequences encoding PP 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, PP itself or a fragment thereof may be synthesized using chemical methods. For example, peptide synthesis
25 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 PP, or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined with sequences from other
30 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.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

(See, e.g., Creighton, supra, pp. 28-53.)

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.)

5 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 PP. For example, routine cloning, subcloning, and propagation of polynucleotide sequences encoding PP 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 PP 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.)

10 When large quantities of PP are needed, e.g. for the production of antibodies, vectors which direct high level expression of PP 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 PP. 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.)

15 20

Plant systems may also be used for expression of PP. Transcription of sequences encoding PP 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.)

25 30

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP 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
5 infective virus which expresses PP 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
10 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 PP in cell lines is preferred. For example, sequences encoding PP can be transformed into cell lines
15 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
20 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 *aprt*⁻ cells, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1977) Cell 11:223-232;
25 Lowy, I. et al. (1980) Cell 22:817-823.) Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate; *neo* confers resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418; and *als* and *pat* confer resistance to chloresulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively. (See, e.g., Wigler, M. et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567-3570; Colbere-Garapin, F. et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1-14.)
30 Additional selectable genes have been described, e.g., *trpB* and *hisD*, which alter cellular requirements for metabolites. (See, e.g., Hartman, S.C. and R.C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051.) Visible markers, e.g., anthocyanins, green fluorescent proteins (GFP; Clontech), β glucuronidase and its substrate β -glucuronide, or luciferase and its substrate luciferin may be used. These markers can be used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing
5 sequences encoding PP can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding PP 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.

10 In general, host cells that contain the nucleic acid sequence encoding PP and that express PP 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.

15 Immunological methods for detecting and measuring the expression of PP 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 PP is preferred, but a competitive binding assay
20 may be employed. These and other assays are well known in the art. (See, e.g., Hanpton, 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
25 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 PP include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding PP, 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
30 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,

WO 01/96546

PCT/US01/19442

cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding PP 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 5 polynucleotides which encode PP may be designed to contain signal sequences which direct secretion of PP 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 10 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 15 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 PP 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 PP protein containing a 20 heterologous moiety that can be recognized by a commercially available antibody may facilitate the screening of peptide libraries for inhibitors of PP 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 25 immobilized glutathione, maltose, phenylarsine oxide, calmodulin, and metal-chelate resins, respectively. FLAG, *c-myc*, and hemagglutinin (HA) enable immunofluorescence 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 30 located between the PP encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that PP 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 PP may be achieved *in vitro*

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

5 PP of the present invention or fragments thereof may be used to screen for compounds that specifically bind to PP. At least one and up to a plurality of test compounds may be screened for specific binding to PP. 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
10 PP, 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 PP 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
15 involves producing appropriate cells which express PP, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, *Drosophila*, or *E. coli*. Cells expressing PP or cell membrane fractions which contain PP are then contacted with a test compound and binding, stimulation, or inhibition of activity of either PP or the compound is analyzed.

An assay may simply test binding of a test compound to the polypeptide, wherein binding is
20 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 PP, either in solution or affixed to a solid support, and detecting the binding of PP 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
25 product mixtures, and the test compound(s) may be free in solution or affixed to a solid support.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

Polynucleotides encoding PP 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 PP 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 PP 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 PP, e.g., by secreting PP 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 PP and protein phosphatases. In addition, the expression of PP is closely associated with cardiovascular tissue and brain tissue; therefore, PP appears to play a role in immune

WO 01/96546

PCT/US01/19442

system disorders, neurological disorders, developmental disorders and cell proliferative disorders, including cancer. In the treatment of disorders associated with increased PP expression or activity, it is desirable to decrease the expression or activity of PP. In the treatment of disorders associated with decreased PP expression or activity, it is desirable to increase the expression or activity of PP.

5 Therefore, in one embodiment, PP 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 PP. Examples of such disorders include, but are not limited to, an immune system disorder, such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), X-linked agammaglobinemia of Bruton, common
10 variable immunodeficiency (CVID), DiGeorge's syndrome (thymic hypoplasia), thymic dysplasia, isolated IgA deficiency, severe combined immunodeficiency disease (SCID), immunodeficiency with thrombocytopenia and eczema (Wiskott-Aldrich syndrome), Chediak-Higashi syndrome, chronic granulomatous diseases, hereditary angioneurotic edema, immunodeficiency associated with Cushing's disease, Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies, ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis,
15 autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxicins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hypercosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis,
20 myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a
25 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
30 disease, prion diseases including kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, nutritional and metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system including

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Down syndrome, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathisia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; a developmental disorder, such as renal tubular acidosis, anemia, Cushing's syndrome, achondroplastic dwarfism, Duchenne and Becker muscular dystrophy, epilepsy, gonadal dysgenesis, 5 WAGR syndrome (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation), Smith-Magenis syndrome, myelodysplastic syndrome, hereditary mucopolysaccharidosis, hereditary keratodermas, hereditary neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease and neurofibromatosis, hypothyroidism, hydrocephalus, seizure disorders such as Sydenham's chorea and cerebral palsy, spina bifida, anencephaly, craniorachischisis, congenital glaucoma, cataract, and sensorineural hearing loss; 10 and a cell proliferative disorder, such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma, myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, 20 ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus.

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

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

In still another embodiment, an agonist which modulates the activity of PP may be administered 30 to a subject to treat or prevent a disorder associated with decreased expression or activity of PP including, but not limited to, those listed above.

In a further embodiment, an antagonist of PP may be administered to a subject to treat or prevent a disorder associated with increased expression or activity of PP. Examples of such disorders include, but are not limited to, those immune system disorders, neurological disorders, developmental

WO 01/96546

PCT/US01/19442

disorders, and cell proliferative disorders, including cancer, described above. In one aspect, an antibody which specifically binds PP 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 PP.

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

10 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.

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

20 For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, rats, mice, humans, and others may be immunized by injection with PP 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 *Cornebacterium parvum* are especially preferable.

30 It is preferred that the oligopeptides, peptides, or fragments used to induce antibodies to PP 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 PP 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 PP may be prepared using any technique which provides for the

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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
5 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,
10 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 PP-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.)

15 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.)

20 Antibody fragments which contain specific binding sites for PP 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.)

25 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 PP and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive to two
30 non-interfering PP 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 PP. Affinity is expressed as an association constant, K_a, which is defined as the molar concentration of PP-antibody complex divided by the molar

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP epitopes, represents the average affinity, or avidity, of the antibodies for PP. The K_a determined for a preparation of monoclonal antibodies, which are monospecific for a particular PP 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 PP-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 PP, 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 PP-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 PP, 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 PP. 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 PP. (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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP may be used for somatic or germline gene therapy. Gene therapy may be performed to (i) correct a genetic deficiency (e.g., in the cases of severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease characterized by X-linked inheritance (Cavazzana-Calvo, M. et al. (2000) *Science* 288:669-672), severe combined immunodeficiency syndrome associated with an inherited adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaese, R.M. et al. (1995) *Science* 270:475-480; Bordignon, C. et al. (1995) *Science* 270:470-475), cystic fibrosis (Zabner, J. et al. (1993) *Cell* 75:207-216; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:643-666; Crystal, R.G. et al. (1995) *Hum. Gene Therapy* 6:667-703), thalassemias, familial hypercholesterolemia, and hemophilia resulting from Factor VIII or Factor IX deficiencies (Crystal, R.G. (1995) *Science* 270:404-410; Verma, I.M. and N. Somia (1997) *Nature* 389:239-242)), (ii) express a conditionally lethal gene product (e.g., in the case of cancers which result from unregulated cell proliferation), or (iii) express a protein which affords protection against intracellular parasites (e.g., against human retroviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) (Baltimore, D. (1988) *Nature* 335:395-396; Poeschla, E. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11395-11399), 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 PP expression or regulation causes disease, the expression of PP 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 PP are treated by constructing mammalian expression vectors encoding PP and introducing these vectors by mechanical means into PP-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 PP include, but are not limited to, the pCDNA 3.1, EPITAG, PRCCMV2, PREP, PVAX vectors (Invitrogen, Carlsbad CA), PCMV-SCRIPT, PCMV-TAG, PEGSH/PERV (Stratagene, La Jolla CA), and PTET-OFF, PTET-ON, PTRE2, PTRE2-LUC, PTK-HYG (Clontech, Palo Alto CA). PP may be expressed using (i) a constitutively active promoter, (e.g., from cytomegalovirus (CMV), Rous sarcoma virus (RSV),

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 5 ecdysone-inducible promoter (available in the plasmids PVGRXR and PIND; Invitrogen); the FK506/rapamycin inducible promoter; or the RU486/mifepristone inducible promoter (Rossi, F.M.V. and Blau, H.M. *supra*)), or (iii) a tissue-specific promoter or the native promoter of the endogenous gene encoding PP from a normal individual.

Commercially available liposome transformation kits (e.g., the PERFECT LIPID 10 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 15 standardized mammalian transfection protocols.

In another embodiment of the invention, diseases or disorders caused by genetic defects with respect to PP expression are treated by constructing a retrovirus vector consisting of (i) the polynucleotide encoding PP 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 20 (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 25 cells or a promiscuous envelope protein such as VSVg (Armentano, D. et al. (1987) J. Virol. 61:1647-1650; Bender, M.A. et al. (1987) J. Virol. 61:1639-1646; Adam, M.A. and A.D. Miller (1988) J. Virol. 62:3802-3806; Dull, T. et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471; Zufferey, R. et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880). U.S. Patent Number 5,910,434 to Rigg ("Method for obtaining retrovirus packaging cell lines producing high transducing efficiency retroviral supernatant") discloses a method for 30 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.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP to cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of PP. The construction and packaging of adenovirus-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. Replication defective adenovirus vectors have proven to be versatile for importing genes encoding immunoregulatory proteins into intact islets in the pancreas (Csete, M.E. et al. (1995) Transplantation 27:263-268). Potentially useful adenoviral vectors are described in U.S. Patent Number 5,707,618 to Armentano ("Adenovirus vectors for gene therapy"), hereby incorporated by reference. For adenoviral vectors, see also 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 PP to target cells which have one or more genetic abnormalities with respect to the expression of PP. The use of herpes simplex virus (HSV)-based vectors may be especially valuable for introducing PP to cells of the central nervous system, for which HSV has a tropism. The construction and packaging of herpes-based vectors are well known to those with ordinary skill in the art. A replication-competent herpes simplex virus (HSV) type 1-based vector has been used to deliver a reporter gene to the eyes of primates (Liu, X. et al. (1999) Exp. Eye Res. 169:385-395). The construction of a HSV-1 virus vector has also been disclosed in detail in U.S. Patent Number 5,804,413 to DeLuca ("Herpes simplex virus strains for gene transfer"), which is hereby incorporated by reference. U.S. Patent Number 5,804,413 teaches the use of recombinant HSV d92 which consists of a genome containing at least one exogenous gene to be transferred to a cell under the control of the appropriate promoter for purposes including human gene therapy. Also taught by this patent are the construction and use of recombinant HSV strains deleted for ICP4, ICP27 and ICP22. For HSV vectors, see also Goins, W.F. et al. (1999) J. Virol. 73:519-532 and Xu, H. et al. (1994) Dev. Biol. 163:152-161, hereby incorporated by reference. The manipulation of cloned herpesvirus sequences, the generation of recombinant virus following the transfection of multiple plasmids containing different segments of the large herpesvirus genomes, the growth and propagation of herpesvirus, and the infection of cells with herpesvirus are techniques well known to those of ordinary skill in the art.

In another alternative, an alphavirus (positive, single-stranded RNA virus) vector is used to deliver polynucleotides encoding PP 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP into the alphavirus genome in place of the capsid-coding region results in the production of a large number of PP-coding RNAs and the synthesis of high levels of PP 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 PP 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 PP.

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.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP. 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 PP. Compounds which may be effective in altering expression of a specific polynucleotide may include, but are not limited to, oligonucleotides, antisense oligonucleotides, triple helix-forming oligonucleotides, transcription factors and other polypeptide transcriptional regulators, and non-macromolecular chemical entities which are capable of interacting with specific polynucleotide sequences. Effective compounds may alter polynucleotide expression by acting as either inhibitors or promoters of polynucleotide expression. Thus, in the treatment of disorders associated with increased PP expression or activity, a compound which specifically inhibits expression of the polynucleotide encoding PP may be therapeutically useful, and in the treatment of disorders associated with decreased PP expression or activity, a compound which specifically promotes expression of the polynucleotide encoding PP 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 PP is exposed to at least one test compound thus obtained. The sample may

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP 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 PP. 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. 28:115) or a human cell line such as HeLa cell (Clarke, M.L. et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 268:8-13). A particular embodiment of the present invention involves screening a combinatorial library of oligonucleotides (such as deoxyribonucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids, and modified oligonucleotides) for antisense activity against a specific polynucleotide sequence (Bruce, T.W. et al. (1997) U.S. Patent No. 5,686,242; Bruce, T.W. et al. (2000) U.S. Patent No. 6,022,691).

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

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

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

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,

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP or fragments thereof. For example, liposome preparations containing a cell-impermeable macromolecule may promote cell fusion and intracellular delivery of the macromolecule. Alternatively, PP 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 PP or fragments thereof, antibodies of PP, and agonists, antagonists or inhibitors of PP, which ameliorates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity may be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or with experimental animals, such as by calculating the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) or LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) statistics. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the LD₅₀/ED₅₀ ratio. Compositions which exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used to formulate a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that includes the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to determine absence, presence, and excess expression of PP, and to monitor regulation of PP levels during therapeutic intervention.

5 In one aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding PP or closely related molecules may be used to identify nucleic acid sequences which encode PP. 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
10 identifies only naturally occurring sequences encoding PP, 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 PP encoding sequences. The hybridization probes of the subject invention may be DNA or RNA and may be derived from the sequence of SEQ ID NO:10-18 or from genomic sequences including promoters, enhancers, and introns of the PP gene.

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

Polynucleotide sequences encoding PP may be used for the diagnosis of disorders associated with expression of PP. Examples of such disorders include, but are not limited to, an immune system disorder, such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), X-linked agammaglobinemia of
25 Bruton, common variable immunodeficiency (CVI), DiGeorge's syndrome (thymic hypoplasia), thymic dysplasia, isolated IgA deficiency, severe combined immunodeficiency disease (SCID), immunodeficiency with thrombocytopenia and eczema (Wiskott-Aldrich syndrome), Chediak-Higashi syndrome, chronic granulomatous diseases, hereditary angioneurotic edema, immunodeficiency associated with Cushing's disease, Addison's disease, adult respiratory distress syndrome, allergies,
30 ankylosing spondylitis, amyloidosis, anemia, asthma, atherosclerosis, autoimmune hemolytic anemia, autoimmune thyroiditis, autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED), bronchitis, cholecystitis, contact dermatitis, Crohn's disease, atopic dermatitis, dermatomyositis, diabetes mellitus, emphysema, episodic lymphopenia with lymphocytotoxins, erythroblastosis fetalis, erythema nodosum, atrophic gastritis, glomerulonephritis, Goodpasture's

WO 01/96546

PCT/US01/19442

syndrome, gout, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, hyper eosinophilia, irritable bowel syndrome, multiple sclerosis, myasthenia gravis, myocardial or pericardial inflammation, osteoarthritis, osteoporosis, pancreatitis, polymyositis, psoriasis, Reiter's syndrome, rheumatoid arthritis, scleroderma, Sjögren's syndrome, systemic anaphylaxis, systemic lupus erythematosus, systemic

5 sclerosis, thrombocytopenic purpura, ulcerative colitis, uveitis, Werner syndrome, complications of cancer, hemodialysis, and extracorporeal circulation, viral, bacterial, fungal, parasitic, protozoal, and helminthic infections, and trauma; a 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

10 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

15 metabolic diseases of the nervous system, neurofibromatosis, tuberous sclerosis, cerebelloretinal hemangioblastomatosis, encephalotrigeminal syndrome, mental retardation and other developmental disorders of the central nervous system including Down syndrome, cerebral palsy, neuroskeletal disorders, autonomic nervous system disorders, cranial nerve disorders, spinal cord diseases, muscular dystrophy and other neuromuscular disorders, peripheral nervous system disorders, dermatomyositis

20 and polymyositis, inherited, metabolic, endocrine, and toxic myopathies, myasthenia gravis, periodic paralysis, mental disorders including mood, anxiety, and schizophrenic disorders, seasonal affective disorder (SAD), akathesia, amnesia, catatonia, diabetic neuropathy, tardive dyskinesia, dystonias, paranoid psychoses, postherpetic neuralgia, Tourette's disorder, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and familial frontotemporal dementia; a developmental disorder, such as

25 renal tubular acidosis, anemia, Cushing's syndrome, achondroplastic dwarfism, Duchenne and Becker muscular dystrophy, epilepsy, gonadal dysgenesis, WAGR syndrome (Wilms' tumor, aniridia, genitourinary abnormalities, and mental retardation), Smith-Magenis syndrome, myelodysplastic syndrome, hereditary mucoc epithelial dysplasia, hereditary keratodermas, hereditary neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease and neurofibromatosis, hypothyroidism, hydrocephalus, seizure

30 disorders such as Sydenham's chorea and cerebral palsy, spina bifida, anencephaly, craniorachischisis, congenital glaucoma, cataract, and sensorineural hearing loss; and a cell proliferative disorder, such as actinic keratosis, arteriosclerosis, atherosclerosis, bursitis, cirrhosis, hepatitis, mixed connective tissue disease (MCTD), myelofibrosis, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, polycythemia vera, psoriasis, primary thrombocythemia, and cancers including adenocarcinoma, leukemia, lymphoma, melanoma,

WO 01/96546

PCT/US01/19442

myeloma, sarcoma, teratocarcinoma, and, in particular, cancers of the adrenal gland, bladder, bone, bone marrow, brain, breast, cervix, gall bladder, ganglia, gastrointestinal tract, heart, kidney, liver, lung, muscle, ovary, pancreas, parathyroid, penis, prostate, salivary glands, skin, spleen, testis, thymus, thyroid, and uterus. The polynucleotide sequences encoding PP 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 PP expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP 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 PP, or a fragment of a polynucleotide complementary to the polynucleotide encoding PP, 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 PP 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 PP are used to amplify DNA using the polymerase chain reaction (PCR). The DNA may be derived, for example, from diseased or normal tissue, biopsy samples, bodily fluids, and the like. SNPs in the DNA cause differences in the secondary and tertiary structures of PCR products in single-stranded form, and these differences are detectable using gel electrophoresis in non-denaturing gels. In fSSCP, the oligonucleotide primers are fluorescently labeled, which allows detection of the amplimers in high-throughput equipment such as DNA sequencing machines. Additionally, sequence database analysis methods, termed *in silico* SNP (isSNP), are capable of identifying polymorphisms by comparing the sequence of individual overlapping DNA fragments which assemble into a common consensus sequence. These computer-based methods filter out sequence variations due to laboratory preparation of DNA and sequencing errors using statistical models and automated analyses of DNA sequence chromatograms. In the alternative, SNPs may be detected and characterized by mass spectrometry using, for example, the high throughput MASSARRAY system (Sequenom, Inc., San Diego CA).

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

(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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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
5 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 PP to quantify the
10 levels of PP 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; Mendoz, L.G. et al. (1999) *Biotechniques* 27:778-788). Detection may be performed by a variety of methods known in the art, for example, by reacting the proteins in the sample with a thiol- or amino-
15 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
20 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
25 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
30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 PP 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 PP 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

In additional embodiments, the nucleotide sequences which encode PP 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, in particular U.S. Serial Number 60/212,447, U.S. Serial Number 60/213,746, U.S. Serial Number 60/215,210, U.S. Serial Number 60/216,529, U.S. Serial Number 60/218,080, and U.S. Serial Number 60/220,117, are expressly incorporated by reference herein.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

EXAMPLES

I. Construction of cDNA Libraries

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

Phenol extraction and precipitation of RNA were repeated as necessary to increase RNA purity. In some cases, RNA was treated with DNase. For most libraries, poly(A)⁺ RNA was isolated using oligo d(T)-coupled paramagnetic particles (Promega), OLIGOTEX latex particles (QIAGEN, Chatsworth CA), or an OLIGOTEX mRNA purification kit (QIAGEN). Alternatively, RNA was isolated directly from tissue lysates using other RNA isolation kits, e.g., the POLY(A)PURE mRNA 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), or pINCY (Incyte Genomics, Palo Alto CA), or derivatives thereof. Recombinant plasmids were transformed into competent *E. coli* cells including XL1-Blue, XL1-BlueMRF, or SOLR from Stratagene or DH5 α , DH10B, or ElectroMAX DH10B from Life Technologies.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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.

5 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
10 (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
15 (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
20 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
25 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
30 GenBank primate, rodent, mammalian, vertebrate, and eukaryote databases, and BLOCKS, PRINTS, DOMO, PRODOM, and hidden Markov model (HMM)-based protein family databases such as PFAM. (HMM is a probabilistic approach which analyzes consensus primary structures of gene families. See, for example, Eddy, S.R. (1996) Curr. Opin. Struct. Biol. 6:361-365.) The queries were performed using programs based on BLAST, FASTA, BLIMPS, and HMMER. The Incyte cDNA

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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. 5 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, 10 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 15 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 20 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).

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

IV. Identification and Editing of Coding Sequences from Genomic DNA

30 Putative protein phosphatases 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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 protein phosphatases, the encoded polypeptides were analyzed by querying against PFAM models for protein phosphatases. Potential protein phosphatases were also identified by homology to Incyte cDNA sequences that had been annotated as protein phosphatases. These selected Genscan-predicted sequences were then compared by BLAST analysis to the genpept and gbpr 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 gbpr public

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

5 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
10 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
15 addition of homologous genomic sequences. The resultant stretched sequences were examined to determine whether it contained a complete gene.

VI. Chromosomal Mapping of PP Encoding Polynucleotides

The sequences which were used to assemble SEQ ID NO:10-18 were compared with sequences from the Incyte LIFESEQ database and public domain databases using BLAST and other
20 implementations of the Smith-Waterman algorithm. Sequences from these databases that matched SEQ ID NO:10-18 were assembled into clusters of contiguous and overlapping sequences using assembly algorithms such as Phrap (Table 7). Radiation hybrid and genetic mapping data available from public resources such as the Stanford Human Genome Center (SHGC), Whitehead Institute for Genome Research (WIGR), and Généthon were used to determine if any of the clustered sequences had been
25 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
30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

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

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

The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. The product score is a normalized value between 0 and 100, and is calculated as follows: the BLAST score is multiplied by the percent nucleotide identity and the product is divided by (5 times the length of the shorter of the two sequences). The BLAST score is calculated by assigning a score of +5 for every base that matches in a high-scoring segment pair (HSP), and -4 for every mismatch. Two sequences may share more than one HSP (separated by gaps). If there is more than one HSP, then the pair with the highest BLAST score is used to calculate the product score. The product score represents a balance between fractional overlap and quality in a BLAST alignment. For example, a product score of 100 is produced only for 100% identity over the entire length of the shorter of the two sequences being compared. A product score of 70 is produced either by 100% identity and 70% overlap at one end, or by 88% identity and 100% overlap at the other. A product score of 50 is

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

10 **VIII. Extension of PP 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 15 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 20 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 Mg²⁺, (NH₄)₂SO₄, and 2-mercaptoethanol, Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), ELONGASE enzyme 25 (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; 30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

(Labsystems Oy, Helsinki, Finland) to measure the fluorescence of the sample and to quantify the concentration of DNA. A 5 μ l to 10 μ l aliquot of the reaction mixture was analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose gel to determine which reactions were successful in extending the sequence.

The extended nucleotides were desalted and concentrated, transferred to 384-well plates, 5 digested with CviII cholera virus endonuclease (Molecular Biology Research, Madison WI), and sonicated or sheared prior to religation into pUC 18 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For shotgun sequencing, the digested nucleotides were separated on low concentration (0.6 to 0.8%) agarose gels, fragments were excised, and agar digested with Agar ACE (Promega). Extended clones were religated using T4 ligase (New England Biolabs, Beverly MA) into pUC 18 vector (Amersham 10 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 15 Pharmacia Biotech) and Pfu DNA polymerase (Stratagene) with the following parameters: Step 1: 94°C, 3 min; Step 2: 94°C, 15 sec; Step 3: 60°C, 1 min; Step 4: 72°C, 2 min; Step 5: steps 2, 3, and 4 repeated 29 times; Step 6: 72°C, 5 min; Step 7: storage at 4°C. DNA was quantified by PICOGREEN reagent (Molecular Probes) as described above. Samples with low DNA recoveries were reamplified using the same conditions as described above. Samples were diluted with 20% dimethylsulfoxide (1:2, 20 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 25 designed for such extension, and an appropriate genomic library.

IX. Labeling and Use of Individual Hybridization Probes

Hybridization probes derived from SEQ ID NO:10-18 are employed to screen cDNAs, genomic DNAs, or mRNAs. Although the labeling of oligonucleotides, consisting of about 20 base pairs, is specifically described, essentially the same procedure is used with larger nucleotide fragments. 30 Oligonucleotides are designed using state-of-the-art software such as OLIGO 4.06 software (National Biosciences) and labeled by combining 50 pmol of each oligomer, 250 μ Ci of [γ -³²P] adenosine triphosphate (Amersham Pharmacia Biotech), and T4 polynucleotide kinase (DuPont NEN, Boston MA). The labeled oligonucleotides are substantially purified using a SEPHADEX G-25 superfine size exclusion dextran bead column (Amersham Pharmacia Biotech). An aliquot containing 10⁷ counts per

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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).

5 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.

10 X. Microarrays

The linkage or synthesis of array elements upon a microarray can be achieved utilizing photolithography, piezoelectric printing (ink-jet printing, See, e.g., Baldeschweiler, supra), mechanical microspotting technologies, and derivatives thereof. The substrate in each of the aforementioned technologies should be uniform and solid with a non-porous surface (Schna (1999), supra). Suggested
15 substrates include silicon, silica, glass slides, glass chips, and silicon wafers. Alternatively, a procedure analogous to a dot or slot blot may also be used to arrange and link elements to the surface of a substrate using thermal, UV, chemical, or mechanical bonding procedures. A typical array may be produced using available methods and machines well known to those of ordinary skill in the art and may contain any appropriate number of elements. (See, e.g., Schna, M. et al. (1995) *Science* 270:467-470;
20 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
25 elements are hybridized with polynucleotides in a biological sample. The polynucleotides in the biological sample are conjugated to a fluorescent label or other molecular tag for ease of detection. After hybridization, nonhybridized nucleotides from the biological sample are removed, and a fluorescence scanner is used to detect hybridization at each array element. Alternatively, laser desorption and mass spectrometry may be used for detection of hybridization. The degree of
30 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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

15 Microarray Preparation

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

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

Array elements are applied to the coated glass substrate using a procedure described in US Patent No. 5,807,522, incorporated herein by reference. 1 μ l of the array element DNA, at an average concentration of 100 ng/ μ l, is loaded into the open capillary printing element by a high-speed robotic apparatus. The apparatus then deposits about 5 nl of array element sample per slide.

Microarrays are UV-crosslinked using a STRATALINKER UV-crosslinker (Stratagene). Microarrays are washed at room temperature once in 0.2% SDS and three times in distilled water. Non-specific binding sites are blocked by incubation of microarrays in 0.2% casein in phosphate buffered saline (PBS) (Tropix, Inc., Bedford MA) for 30 minutes at 60° C followed by washes in

WO 01/96546

PCT/US01/19442

0.2% SDS and distilled water as before.

Hybridization

Hybridization reactions contain 9 μ l of sample mixture consisting of 0.2 μ g each of Cy3 and Cy5 labeled cDNA synthesis products in 5X SSC, 0.2% SDS hybridization buffer. The sample mixture is heated to 65°C for 5 minutes and is aliquoted onto the microarray surface and covered with an 1.8 cm² coverslip. The arrays are transferred to a waterproof chamber having a cavity just slightly larger than a microscope slide. The chamber is kept at 100% humidity internally by the addition of 140 μ l of 5X SSC in a corner of the chamber. The chamber containing the arrays is incubated for about 6.5 hours at 60°C. The arrays are washed for 10 min at 45°C in a first wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS), three times for 10 minutes each at 45°C in a second wash buffer (0.1X SSC), and dried.

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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).

10 XI. Complementary Polynucleotides

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

XII. Expression of PP

20 Expression and purification of PP is achieved using bacterial or virus-based expression systems. For expression of PP 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.

25 Recombinant vectors are transformed into suitable bacterial hosts, e.g., BL21(DE3). Antibiotic resistant bacteria express PP upon induction with isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Expression of PP 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 PP 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

91:3224-3227; Sandig, V. et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:1937-1945.)

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

XIII. Functional Assays

PP function is assessed by expressing the sequences encoding PP at physiologically elevated levels in mammalian cell culture systems. cDNA is subcloned into a mammalian expression vector containing a strong promoter that drives high levels of cDNA expression. Vectors of choice include PCMV SPORT (Life Technologies) and PCR3.1 (Invitrogen, Carlsbad CA), both of which contain the cytomegalovirus promoter. 5-10 μ g of recombinant vector are transiently transfected into a human cell line, for example, an endothelial or hematopoietic cell line, using either liposome formulations or electroporation. 1-2 μ g of an additional plasmid containing sequences encoding a marker protein are co-transfected. Expression of a marker protein provides a means to distinguish transfected cells from nontransfected cells and is a reliable predictor of cDNA expression from the recombinant vector. Marker proteins of choice include, e.g., Green Fluorescent Protein (GFP; Clontech), CD64, or a CD64-GFP fusion protein. Flow cytometry (FCM), an automated, laser optics-based technique, is used to identify transfected cells expressing GFP or CD64-GFP and to evaluate the apoptotic state of the cells and other cellular properties. FCM detects and quantifies the uptake of fluorescent molecules that diagnose events preceding or coincident with cell death. These events include changes in nuclear DNA content as measured by staining of DNA with propidium iodide; changes in cell size and granularity as measured by forward light scatter and 90 degree side light scatter; down-regulation of DNA synthesis as measured by decrease in bromodeoxyuridine uptake; alterations in expression of cell surface and intracellular proteins as measured by reactivity with specific antibodies; and alterations in plasma membrane composition as measured by the binding of fluorescein-conjugated Annexin V protein to the cell surface. Methods in flow cytometry are discussed in Ormerod, M.G. (1994) *Flow Cytometry*,

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Oxford, New York NY.

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

10 **XIV. Production of PP Specific Antibodies**

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

25 **XV. Purification of Naturally Occurring PP Using Specific Antibodies**

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

buffer of pH 2 to pH 3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and PP is collected.

XVI. Identification of Molecules Which Interact with PP

PP, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent. (See, e.g., Bolton A.E. and W.M. Hunter (1973) *Biochem. J.* 133:529-539.) Candidate molecules previously arrayed in the wells of a multi-well plate are incubated with the labeled PP, washed, and any wells with labeled PP complex are assayed. Data obtained using different concentrations of PP are used to calculate values for the number, affinity, and association of PP with the candidate molecules.

Alternatively, molecules interacting with PP 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).

PP 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 PP Activity

PP activity is measured by the hydrolysis of para-nitrophenyl phosphate (PNPP). PP is incubated together with PNPP in HEPES buffer pH 7.5, in the presence of 0.1% β-mercaptoethanol at 37°C for 60 min. The reaction is stopped by the addition of 6 ml of 10 N NaOH (Diamond, R.H. et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14:3752-62). Alternatively, acid phosphatase activity of PP is demonstrated by incubating PP-containing extract with 100 μl of 10 mM PNPP in 0.1 M sodium citrate, pH 4.5, and 50 μl of 40 mM NaCl at 37°C for 20 min. The reaction is stopped by the addition of 0.5 ml of 0.4 M glycine/NaOH, pH 10.4 (Safitig, P. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:18628-18635). The increase in light absorbance at 410 nm resulting from the hydrolysis of PNPP is measured using a spectrophotometer. The increase in light absorbance is proportional to the activity of PP in the assay.

In the alternative, PP activity is determined by measuring the amount of phosphate removed from a phosphorylated protein substrate. Reactions are performed with 2 or 4 nM enzyme in a final volume of 30 μl containing 60 mM Tris, pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol and 10 μM substrate, ³²P-labeled on serine/threonine or tyrosine, as appropriate. Reactions are initiated with substrate and incubated at 30° C for 10-15 min. Reactions are quenched with 450 μl of 4% (w/v) activated charcoal in 0.6 M HCl, 90 mM Na₂P₂O₇, and 2 mM NaH₂PO₄, then centrifuged at 12,000 × g for 5 min. Acid-soluble ³²Pi is quantified by liquid scintillation counting (Sinclair, C. et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23666-23672).

XVIII. Identification of PP Inhibitors

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Compounds to be tested are arrayed in the wells of a 384-well plate in varying concentrations along with an appropriate buffer and substrate, as described in the assays in Example XVII. PP activity is measured for each well and the ability of each compound to inhibit PP activity can be determined, as well as the dose-response kinetics. This assay could also be used to identify molecules which enhance PP activity.

XIX. Identification of PP Substrates

A PP "substrate-trapping" assay takes advantage of the increased substrate affinity that may be conferred by certain mutations in the PTP signature sequence. PP bearing these mutations form a stable complex with their substrate; this complex may be isolated biochemically. Site-directed mutagenesis of invariant residues in the PTP signature sequence in a clone encoding the catalytic domain of PP is performed using a method standard in the art or a commercial kit, such as the MUTA-GENE kit from BIO-RAD. For expression of PP mutants in *Escherichia coli*, DNA fragments containing the mutation are exchanged with the corresponding wild-type sequence in an expression vector bearing the sequence encoding PP or a glutathione S-transferase (GST)-PP fusion protein. PP mutants are expressed in *E. coli* and purified by chromatography.

The expression vector is transfected into COS1 or 293 cells via calcium phosphate-mediated transfection with 20 µg of CsCl-purified DNA per 10-cm dish of cells or 8 µg per 6-cm dish. Forty-eight hours after transfection, cells are stimulated with 100 ng/ml epidermal growth factor to increase tyrosine phosphorylation in cells, as the tyrosine kinase EGFR is abundant in COS cells. Cells are lysed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5/5 mM EDTA/150 mM NaCl/1% Triton X-100/5 mM iodoacetic acid/10 mM sodium phosphate/10 mM NaF/5 µg/ml leupeptin/5 µg/ml aprotinin/1 mM benzamide (1 ml per 10-cm dish, 0.5 ml per 6-cm dish). PP is immunoprecipitated from lysates with an appropriate antibody. GST-PP fusion proteins are precipitated with glutathione-Sepharose, 4 µg of mAb or 10 µl of beads respectively per mg of cell lysate. Complexes can be visualized by PAGE or further purified to identify substrate molecules (Flint, A.J. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1680-1685).

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
8124196	1	8124196CD1	10	8124196CB1
7475604	2	7475604CD1	11	7475604CB1
1437588	3	1437588CD1	12	1437588CB1
7475851	4	7475851CD1	13	7475851CB1
320957	5	320957CD1	14	320957CB1
5370098	6	5370098CD1	15	5370098CB1
3015131	7	3015131CD1	16	3015131CB1
7475850	8	7475850CD1	17	7475850CB1
7475850	9	7475850CD1	18	7475850CB1

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 2

Polypeptide SEQ ID NO:	Incyte Polypeptide ID	GenBank ID NO.	Probability score	GenBank Homology
1	812419CD1	G1945140	1.e-30	AB12 protein phosphatase 2C (Arabidopsis thaliana) [Arabidopsis thaliana] (1997) The Arabidopsis ARSISIC ACTD-INSENSITIVE (AB12) and AB11 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. Plant Cell 9:759-771.
2	747360CD1	G6652782	6.7e-34	Protein phosphatase [Homo sapiens]. Nakamura, K. et al. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase with homology to the mammalian spermatozoa. Biochem. J. 344:813-825.
3	1437586CD1	G292376	4e-81	Protein tyrosine phosphatase [Homo sapiens]. Rohan, P.J. et al. (1993) PAC-1, a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. Science 259:1763-1766.
4	7476861CD1	G2665458	1e-155	Protein-tyrosine-phosphatase [Mus musculus]. Ohnagi, M. et al. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel cytoplasmic protein-tyrosine phosphatase. J. Biol. Chem. 272:33092-33099.
5	5320695CD1	G5714762	1e-178	Serine/threonine protein phosphatase pP2A-4 catalytic subunit [Oryza sativa subsp. indica]
6	8116710CD1	G452192	3.6e-32	protein tyrosine phosphatase (PTP-BAS type 2) [Homo sapiens]. Maekawa, K. et al. (1994) FEBS Lett 337:200-206
7	5370008CD1	G957217	1.4e-294	Striatum-enriched phosphatase [Homo sapiens]. Li, X. et al. (1995) Genomics 28:447-449.
8	3016191CD1	G3451473	7.0e-41	4-nitrophenylphosphatase [Schizosaccharomyces pombe].
9	7476861CD1	G7542482	4.1e-36	Bas-associated phosphatase-1 [Homo sapiens].

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
5	5320695CD1	313	S183 S205 S216 S278 T149 R305 Y156 Y84	N233	Ser/Thr protein phosphatase: L14-R298 Serine/threonine specific protein phosphatases proteins BL00125A:F55-V91, BL00125B:S97-G142, BL00125C:A151-E207, BL00125A:G221-K275 Serine/threonine phosphatase family signature PRO0114A:F55-T82, PRO0114B:Y84-Y111, PRO0114C:I117-Y141, PRO0114D:D152-L178, PRO0114E:L181-Q208, PRO0114F:N237-E257, PRO0114G:K259-K275 Serine/threonine specific protein phosphatases signature: Y98-N143 PHOSPHATASE SERINE/THREONINE HYDROLASE IRON MANGANESE SUBUNIT MULTIGENE FAMILY PD000252:L14-R299 SIMILAR TO SERINE/THREONINE PHOSPHATASE PD112259:E29-H113 PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE DM00133 S52659 11-307:L14-T308 DM00133 Q07099 4-300:G12-T308 DM00133 E23636 20-316:G12-T308 DM00133 F48571 4-300:H14-R307 Ser_Thr_Phosphatase: L118-E123	HMMER-PFAM BLIMPS_BLOCKS BLIMPS-PRIMYS PROFILINSCAN BLAST-PRODOM BLAST-PRODOM BLAST-DOMO MOTIFS

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
6	8116710CD1	622	S124 S189 S286 S320 S375 S382 S395 S436 S490 S510 S544 S605 S73 T211 T252 T406 T536 T538 T604 T613 Y182		Band 4.1 family domain: BL00660D:P272-P295 BAND 4.1 PROTEIN FAMILY PR0935A:L49-V61, PR00935C:I147-F167, PR0935D:L214-A230 CYTOSKELETON STRUCTURAL PHOSPHATASE HYDROLASE PROTEIN TYROSINE PHOSPHORYLATION MORFIN TYROSINE BAND: PD000961:V18-Y234 BAND 4 DM00609 A54971 562-990:D14-K379 DM00609 P31976 1-405:W84-R367, K336-S382, D25-A88 DM00609 P26038 1-405:P106-R367, D25-L76 DM00609 P35241 1-406:W84-R367, D25-E87 Transmembrane Domain: L122-L142 Protein-tyrosine phosphatase: L298-L530 Tyrosine specific protein phosphatases proteins EL00383A:K301-Y315, BL00383B:S327-I335, BL00383C:D358-T368, BL00383D:H429-P444, BL00383E:V470-G480, BL00383F:N508-F522, Protein tyrosine phosphatase signature PR00700A:S328-I335, PR00700B:Y345-Q365, PR00700C:R425-D442, PR00700D:P467-T485, PR00700E:V498-G513, PR00700F:M514-V524 Tyrosine specific protein phosphatases active site: L447-R508 Tyr. Phosphatase: V470-F482	BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS BLAST-PRODOM BLAST-DOMO
7	5370008CD1	541	S160 S221 S244 S249 S28 S4 S47 S420 S434 S529 T144 T168 T209 T318 T355 T375 T59	N222 N91	Transmembrane Domain: L122-L142 Tyrosine specific protein phosphatases EL00383A:K301-Y315, BL00383B:S327-I335, BL00383C:D358-T368, BL00383D:H429-P444, BL00383E:V470-G480, BL00383F:N508-F522, Protein tyrosine phosphatase signature PR00700A:S328-I335, PR00700B:Y345-Q365, PR00700C:R425-D442, PR00700D:P467-T485, PR00700E:V498-G513, PR00700F:M514-V524 Tyrosine specific protein phosphatases active site: L447-R508 Tyr. Phosphatase: V470-F482	HMMER HMMER BLIMPS-BLOCKS BLIMPS-PRINTS PROFILESSCAN MOTIFS

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 3 (cont.)

SEQ ID NO.	Incyte Polypeptide ID	Amino Acid Residues	Potential Phosphorylation Sites	Potential Glycosylation Sites	Signature Sequences, Domains and Motifs	Analytical Methods and Databases
9	7476860CD1	320	S219 S239 S296 S55 S59 S82 T204 T23 T284	N57	PDZ domain (also known as DHR or GLGF): F90-F177 PDZ domain: F400595: I137-N147 GLGF domain: E800224 F54971 I496-1590: Y93-C175	HMMER-PFAM BLIIPS-PFAM BLAST-DONO

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 4

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
10	8124196CB1	1803	1-62, 1399-1803	20528449VI	1004	1893
				21024379L (MEXNDIRB3)	471	379
				76670254H (TNSDLC91)	477	463
11	7473694CB1	1329	369-407, 1012-1329, 644-936	FL7473604-	1	697
				97329576_000027-	1	
12	1437588CB1	1236	1-393	4456507F6 (HEADIR01)	835	1329
				1437588F6 (PANCMPT08)	74	604
				3973781H1 (ADREPT06)	1	262
				441315E1 (MPHGMPT03)	1001	1236
				152225F6 (SFRMNT04)	325	876
				86670639E (SMT028)	1385	192
13	7478681CB1	1914	647-748, 1-168, 1441-1808, 237-330, 1014-1144	5068097BE (BRADIR03)	1385	1924
				70954791VI	815	1347
				712884965VI	473	1013
				70953936VI	1	629
				71285536VI	1158	1738
14	5320695CB1	1263		5914035F7 (BRAIFN03)	474	1263
				71930652VI	1	644
15	8116710CB1	2278	1-78, 408-555, 941-1552	8037858H1 (SKCRUNE01)	1309	1946
				2899801F6 (DRGCMPT01)	903	1353
				8116710H1 (TNSDLC91)	435	1031
				708128281VI	1733	2278
				71225945VI	1518	2180
				6540118H1 (NDIPTX01)	1375	1375
				6481036H1 (MIXDNR01)	1	428
				7408188H1 (UFREDBR05)	283	1004

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 4 (cont.)

Polynucleotide SEQ ID NO:	Incyte Polynucleotide ID	Sequence Length	Selected Fragment(s)	Sequence Fragments	5' Position	3' Position
16	5370008C81	2304	1-129, 1686- 2532, 769-853	6442313HL (BRAENOT02)	2100	2746
				1287380FG (BRAINOT11)	2175	2804
				7584530HL (BRAIFEC01)	553	1230
				71878587V1	1723	2399
				7178936HL (BRAXDIC01)	1	561
17	3016191CB1	1389	1-42, 1014-1289	71879372V1	1298	2029
				71880642V1	1133	1952
				7713736J2 (TESTTUB02)	431	1057
				FL3016191_08575852_000	1	507
				002_06572215_1	549	1013
18	7476866C81	1950	476-754, 846-906, 1212-1950, 1167-1226	3016191FG (MUSCNOT07)	204	786
				6800702J1 (COLENOT03)	957	1220
				3378750HL (PENGNOT01)	1021	1289
				9468900HL (RAMFNOT02)	1032	1950
				70830355V1	977	1493
				5203036FG (BRAFNOT02)	747	1493
				6748531HL (BRAFNOT02)	240	1493
				67485671HL (BRAFNOT02)	27	924
				67485671HL (BRAFNOT02)	20	924
				56861178HL (BRAFNOT02)	1	242

Table 5

Polynucleotide SEQ ID NO.	Incyte Project ID	Representative Library
10	8124195CBL	HEA00C01
11	7473604CBL	HEA01R01
12	4437588CBL	LEUK0T03
13	7476861CBL	BRAD01R01
14	5320655CBL	BRAF0EN03
15	8116710CBL	MIX01R01
16	5370038CBL	BSC0N0T03
17	3016191CBL	MUSC0T07
18	7476860CBL	BRAF0T02

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 6

Library	Vector	Library Description
HEA00C01	PSP08T1	Library was constructed using RNA isolated from the aorta of a 39-year-old Caucasian male, who died from a gunshot wound. Serology was positive for cytomegalovirus (CMV). Patient history included tobacco abuse (one pack of cigarettes per day for 25 years), and occasionally cocaine, marijuana, and alcohol use.
HEAD1E01	P1N1C1	The library was constructed using RNA isolated from diseased right atrium and heart muscle wall tissue removed from a 7-month-old Caucasian male who died from cardiopulmonary arrest due to Pompe's disease. Patient history included Pompe's disease, left ventricular hypertrophy, pyrexia, right complete cleft lip, cleft palate, chronic serous otitis media, hypertrophic cardiomyopathy, congestive heart failure, and developmental delays. Family history included acutemyocardial infarction, diabetes, cystic fibrosis, and Down's syndrome.
LEU0N0P03	P1N1C1	The library was constructed using RNA isolated from white blood cells of a 27-year-old female with blood type A+. The donor tested negative for cytomegalovirus (CMV).
BRAD1E01	P1N1C1	Library was constructed using RNA isolated from diseased choroid plexus tissue of the lateral ventricle, removed from the brain of a 57-year-old Caucasian male, who died from a cerebrovascular accident.
BRA1F003	P1N1C1	This normalized fetal brain tissue library was constructed from 3.26 million independent clones from a fetal brain tissue library. Starting RNA was made from brain tissue removed from a Caucasian male fetus, who was stillborn with a hypoplastic left heart at 23 weeks' gestation. The library was normalized in 2 rounds using conditions adapted from Soares et al., PNAS (1994) 91:9228 and Ronaldo et al., Genome Research 6 (1996):791, except that a significantly longer (48 hours/round) reannealing hybridization was used.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 6 (cont.)

Library	Vector	Library Description
MIXDUN001	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from myometrium removed from a 41-year-old Caucasian female (Donor A) during vaginal hysterectomy with a dilation and curettage and untreated smooth muscle cells removed from the renal vein of a 57-year-old Caucasian male. Pathology for donor A indicated the myometrium and cervix were unremarkable. The endometrium was secretory and contained fragments of endometrial polyps. Benign endo- and ectocervical mucosa were identified in the endocervix. Pathology for the associated tumor tissue indicated uterine leiomyoma. Medical history included an unspecified menstrual disorder, ventral hernia, normal delivery, a benign ovarian neoplasm, and tobacco abuse in donor A. Previous surgeries included a bilateral destruction of fallopian tubes, removal of a solitary ovary, and an exploratory laparotomy in donor A.
BSCN0003	P1NCY	Library was constructed using RNA isolated from caudate nucleus tissue removed from the brain of a 92-year-old male. Pathology indicated several small cerebral infarcts but no senile plaques or neurofibrillary degeneration. Patient history included throat cancer which was treated with radiation.
BRAF0002	p1NCY	Library was constructed using RNA isolated from superior frontal cortex tissue removed from a 62-year-old male. Pathology indicated a glioblastoma. Pathology indicated moderate to severe neurofibrillary degeneration, multiple microinfarctions of the cerebral neocortex, fibrosis and multiple microinfarctions of the cerebral neocortex. Microscopically, the cerebral hemisphere revealed moderate fibrosis of the leptomeninges with focal calcifications. There was evidence of shrunken and slightly eosinophilic pyramidal neurons throughout the cerebral hemispheres. In addition, scattered throughout the cerebral cortex, there were multiple small microscopic areas of cavitation with surrounding gliosis. Patient history included dilated cardiomyopathy, congestive heart failure, cardiomegaly, and an enlarged spleen.
MUSC0007	p1NCY	Library was constructed using RNA isolated from muscle tissue removed from the forearm of a 38-year-old Caucasian female during a soft tissue excision. Pathology for the associated tumor tissue indicated intramuscular hemangioma. Family history included breast cancer, benign hypertension, cerebrovascular disease, colon cancer, and type II diabetes.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

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/PARACCEL PDF	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 at 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=1.0E-6 Assembled ESTs: fasta Identity= 95% or greater and Match length=200 bases or greater; fastx E values=1.0E-8 or less Full Length sequences: fastx scores=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 Atwood, T.K. et al. (1997) J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:417-424.	Probability value= 1.0E-3 or less
EMMER	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. 26:370-372; Durbin, R. et al. (1998) Our World View, in a Nishihel, Cambridge Univ. Press, pp. 1-350.	PFAM hits: Probability value= 1.0E-3 or less Signal peptide hits: Score= 0 or greater

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Table 7 (cont.)

Program	Description	Reference	Parameter Threshold
ProfilesScan	An algorithm that searches for structural and sequence motifs in protein sequences that match sequence patterns defined in Prosite.	Gritskov, M. et al. (1988) CABIOS 4:61-66; Gritskov, M. et al. (1989) Methods Enzymol. 183:146-159; Bartsch, A. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:217-221.	Normalized quality scores: GCG-specified "E[ICGF]" value for that particular Prosite motif. Generally, scores=1.4-2.1.
Phred	A base-calling algorithm that examines automated sequence 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 Phile Revised Assembly Program including SWAT and CrossMatch programs based on efficient implementation of the Smith-Waterman algorithm, useful in searching sequence homology and assembling DNA sequences.	Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489; Smith, T.F. and M.S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197. and Green, P., University of Washington, Seattle, WA.	Scores= 120 or greater; Match length= 50 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.	Nielsen, H. et al. (1997) Protein Engineering 10:1-6; Clavette, J.M. and S. Audic (1997) CABIOS 12:431-439.	Scores=3.5 or greater
TMAP	A program that uses weight matrices to delineate transmembrane segments on protein sequences and determine orientation.	Pearson, B. and P. Argos (1994) J. Mol. Biol. 237:182-192; Pearson, 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.	

WO 01/96546

PCT/US01/19442

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:
 - a) a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of
5 SEQ ID NO:1-9,
 - b) a 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:1-7,
 - c) a polypeptide comprising a naturally occurring amino acid sequence at least 80% identical
to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:8-9,
 - 10 d) a biologically active fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from
the group consisting of SEQ ID NO:1-9, and
 - e) an immunogenic fragment of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the
group consisting of SEQ ID NO:1-9.
- 15 2. An isolated polypeptide of claim 1 selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.
3. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 1.
4. An isolated polynucleotide encoding a polypeptide of claim 2.
- 20 5. An isolated polynucleotide of claim 4 selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-
18.
6. A recombinant polynucleotide comprising a promoter sequence operably linked to a
25 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.
- 30 9. A method for 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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

1, and

b) recovering the polypeptide so expressed.

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

5

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

a) a polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-18,

10 identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:10-16,

c) a polynucleotide comprising a naturally occurring polynucleotide sequence at least 80% identical to a polynucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:17-18,

d) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of a),

e) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of b),

15 f) a polynucleotide complementary to a polynucleotide of c), and

g) an RNA equivalent of a)-f).

12. An isolated polynucleotide comprising at least 60 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11.

20

13. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:

25 a) hybridizing the sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides comprising a sequence complementary to said target polynucleotide in the sample, and which probe specifically hybridizes to said target polynucleotide, under conditions whereby a hybridization complex is formed between said probe and said target polynucleotide or fragments thereof, and

b) detecting the presence or absence of said hybridization complex, and, optionally, if present, the amount thereof.

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

15. A method for detecting a target polynucleotide in a sample, said target polynucleotide having a sequence of a polynucleotide of claim 11, the method comprising:

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

WO 01/96546

PCT/US01/19442

amplification, and

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

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

 17. A composition of claim 16, wherein the polypeptide has an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

10

 18. A method for treating a disease or condition associated with decreased expression of functional PP, comprising administering to a patient in need of such treatment the composition of claim 16.

15

 19. A method for screening a compound for effectiveness as an agonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
- b) detecting agonist activity in the sample.

20

 20. A composition comprising an agonist compound identified by a method of claim 19 and a pharmaceutically acceptable excipient.

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

25 20.

 22. A method for screening a compound for effectiveness as an antagonist of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

- a) exposing a sample comprising a polypeptide of claim 1 to a compound, and
- b) detecting antagonist activity in the sample.

30

 23. A composition comprising an antagonist compound identified by a method of claim 22 and a pharmaceutically acceptable excipient.

35

 24. A method for treating a disease or condition associated with overexpression of functional

WO 01/96546

PCT/US01/19442

PP, comprising administering to a patient in need of such treatment a composition of claim 23.

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

- 5 a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under suitable conditions, and
b) detecting binding of the polypeptide of claim 1 to the test compound, thereby identifying a compound that specifically binds to the polypeptide of claim 1.

10 26. A method of screening for a compound that modulates the activity of the polypeptide of claim 1, said method comprising:

- a) combining the polypeptide of claim 1 with at least one test compound under conditions permissive for the activity of the polypeptide of claim 1,
b) assessing the activity of the polypeptide of claim 1 in the presence of the test compound, and
15 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.

20 27. A method for screening a compound for effectiveness in altering expression of a target polynucleotide, wherein said target polynucleotide comprises a sequence of claim 5, the method comprising:

- a) exposing a sample comprising the target polynucleotide to a compound, under conditions suitable for the expression of the target polynucleotide,
25 b) detecting altered expression of the target polynucleotide, and
c) comparing the expression of the target polynucleotide in the presence of varying amounts of the compound and in the absence of the compound.

28. A method for assessing toxicity of a test compound, said method comprising:

- 30 a) treating a biological sample containing nucleic acids with the test compound;
b) hybridizing the nucleic acids of the treated biological sample with a probe comprising at least 20 contiguous nucleotides of a polynucleotide of claim 11 under conditions whereby a specific hybridization complex is formed between said probe and a target polynucleotide in the biological sample, said target polynucleotide comprising a polynucleotide sequence of a polynucleotide of claim

WO 01/96546

PCT/US01/19442

11 or fragment thereof;

- c) quantifying the amount of hybridization complex; and
- d) comparing the amount of hybridization complex in the treated biological sample with the amount of hybridization complex in an untreated biological sample, wherein a difference in the amount of hybridization complex in the treated biological sample is indicative of toxicity of the test compound.

29. A diagnostic test for a condition or disease associated with the expression of PP in a biological sample comprising the steps of:

- a) combining the biological sample with an antibody of claim 10, 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.

30. The antibody of claim 10, 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.

31. A composition comprising an antibody of claim 10 and an acceptable excipient.

32. A method of diagnosing a condition or disease associated with the expression of PP in a subject, comprising administering to said subject an effective amount of the composition of claim 31.

33. A composition of claim 31, wherein the antibody is labeled.

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

35. A method of preparing a polyclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 10 comprising:

- a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from

WO 01/96546

PCT/US01/19442

the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;

- b) isolating antibodies from said animal; and
- c) screening the isolated antibodies with the polypeptide, thereby identifying a polyclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

36. An antibody produced by a method of claim 35.

37. A composition comprising the antibody of claim 36 and a suitable carrier.

38. A method of making a monoclonal antibody with the specificity of the antibody of claim 10 comprising:

- a) immunizing an animal with a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9, or an immunogenic fragment thereof, under conditions to elicit an antibody response;
- b) isolating antibody producing cells from the animal;
- c) fusing the antibody producing cells with immortalized cells to form monoclonal antibody-producing hybridoma cells;
- d) culturing the hybridoma cells; and
- e) isolating from the culture monoclonal antibody which binds specifically to a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

39. A monoclonal antibody produced by a method of claim 38.

40. A composition comprising the antibody of claim 39 and a suitable carrier.

41. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a Fab expression library.

42. The antibody of claim 10, wherein the antibody is produced by screening a recombinant immunoglobulin library.

43. A method for detecting a polypeptide having an amino acid sequence selected from the

WO 01/96546

PCT/US01/19442

group consisting of SEQ ID NO:1-9 in a sample, comprising the steps of:

- a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and
- b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 in the sample.

44. A method of purifying a polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9 from a sample, the method comprising:

- a) incubating the antibody of claim 10 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the polypeptide; and
- b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified polypeptide having an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1-9.

45. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1.

46. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

47. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.

48. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

49. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:5.

50. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

51. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.

52. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

53. A polypeptide of claim 1, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.

54. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:10.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

55. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:11.
56. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12.
57. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:13.
58. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:14.
59. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:15.
60. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:16.
61. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:17.
62. A polynucleotide of claim 11, comprising the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:18.

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

<110> INCYTE GENOMICS, INC.
AU-YOUNG, Janice
BAUGHN, Mariah R.
DING, Li
ELLIOTT, Vicki S.
GANDHI, Ameena R.
GRIFFIN, Jennifer A.
HAFALIA, April
KEARNIEY, Liam
LEE, Ernestine A.
LU, Yan
NGUYEN, Damiel B.
PATERSON, Chandra
RAMKUMAR, Jayalaxmi
REDDY, Roopa
SANJANWALA, Madhu S.
STEWART, Elizabeth A.
TANG, Y. Tom
THORNTON, Michael
TRIBOULEY, Catherine M.
WALIA, Marinder K.
YANG, Junming
YAO, Monique G.
YUE, Henry

<120> PROTEIN PHOSPHATASES

<130> PI-0126 PCT

<140> To Be Assigned
<141> Herewith

<150> 60/212,447; 60/213,746; 60/215,210; 60/216,529; 60/218,080; 60/220,117
<151> 2000-06-16; 2000-06-22; 2000-06-29; 2000-07-06; 2000-07-12; 2000-07-21

<160> 18

<170> PERL Program

<210> 1
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 8124196CD1

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

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

Asp Phe Cys His Thr His Met Glu Lys Cys Ile Met Asp Leu Leu
140 145 150
Pro Lys Glu Lys Asn Leu Glu Thr Leu Leu Thr Leu Ala Phe Leu
155 160 165
Glu Ile Asp Lys Ala Phe Ser Ser His Ala Arg Leu Ser Ala Asp
170 175 180
Ala Thr Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Ala Thr Val Ala Leu Leu
185 190 195
Arg Asp Gly Ile Glu Leu Val Val Ala Ser Val Gly Asp Ser Arg
200 205 210
Ala Ile Leu Cys Arg Lys Gly Lys Pro Met Lys Leu Thr Ile Asp
215 220 225
His Thr Pro Glu Arg Lys Asp Glu Lys Glu Arg Ile Lys Lys Cys
230 235 240
Gly Gly Phe Val Ala Trp Asn Ser Leu Gly Gln Pro His Val Asn
245 250 255
Gly Arg Leu Ala Met Thr Arg Ser Ile Gly Asp Leu Asp Leu Lys
260 265 270
Thr Ser Gly Val Ile Ala Glu Pro Glu Thr Lys Arg Ile Lys Leu
275 280 285
His His Ala Asp Asp Ser Phe Leu Val Leu Thr Thr Asp Gly Ile
290 295 300
Asn Phe Met Val Asn Ser Gln Glu Ile Cys Asp Phe Val Asn Gln
305 310 315
Cys His Asp Pro Asn Glu Ala Ala His Ala Val Thr Glu Gln Ala
320 325 330
Ile Gln Tyr Gly Thr Glu Asp Asn Ser Thr Ala Val Val Val Pro
335 340 345
Phe Gly Ala Trp Gly Lys Tyr Lys Asn Ser Glu Ile Asn Phe Ser
350 355 360
Phe Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ser Gly Arg Trp Ala
365 370

```

```

<210> 2
<211> 405
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7473604CD1

```

```

<400> 2
Met Leu Glu Ser Ala Glu Gln Leu Leu Val Glu Asp Leu Tyr Asn
1 5 10 15
Arg Val Arg Glu Lys Met Asp Asp Thr Ser Leu Tyr Asn Thr Pro
20 25 30
Cys Val Leu Asp Leu Gln Arg Ala Leu Val Gln Asp Arg Gln Glu
35 40 45
Ala Pro Trp Asn Glu Val Asp Glu Val Trp Pro Asn Val Phe Ile
50 55 60
Ala Asp Arg Ser Val Ala Val Asn Lys Gly Arg Leu Lys Arg Leu
65 70 75
Gly Ile Thr His Ile Leu Asn Ala Ala His Gly Thr Gly Val Tyr
80 85 90
Thr Gly Pro Glu Phe Tyr Thr Gly Leu Glu Ile Gln Tyr Leu Gly
95 100 105
Val Glu Val Asp Asp Phe Pro Glu Val Asp Ile Ser Gln His Phe
110 115 120
Arg Lys Ala Tyr Cys His Tyr Ile Ile Phe Ser Cys Val Phe Ile
125 130 135
Ser Gly Lys Val Leu Val Ser Ser Glu Met Gly Ile Ser Arg Ser
140 145 150
Ala Val Leu Val Val Ala Tyr Leu Met Ile Phe His Asn Met Ala
155 160 165
Ile Leu Glu Ala Leu Met Thr Val Arg Lys Lys Arg Ala Ile Tyr
170 175 180

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Pro Asn Glu Gly Phe Leu Lys Gln Leu Arg Glu Leu Asn Glu Lys
 185 190 195
 Leu Met Glu Glu Arg Glu Glu Asp Tyr Gly Arg Glu Gly Gly Ser
 200 205 210
 Ala Glu Ala Glu Glu Gly Glu Gly Thr Gly Ser Met Leu Gly Ala
 215 220 225
 Arg Val His Ala Leu Thr Val Glu Glu Glu Asp Asp Ser Ala Ser
 230 235 240
 His Leu Ser Gly Ser Ser Leu Gly Lys Ala Thr Gln Ala Ser Lys
 245 250 255
 Pro Leu Thr Leu Ile Asp Glu Glu Glu Glu Lys Lys Leu Tyr Glu
 260 265 270
 Gln Trp Lys Lys Gly Gln Gly Leu Leu Ser Asp Lys Val Pro Gln
 275 280 285
 Asp Gly Gly Gly Trp Arg Ser Ala Ser Ser Gly Gln Gly Gly Glu
 290 295 300
 Glu Leu Glu Asp Glu Asp Val Glu Arg Ile Ile Gln Glu Trp Gln
 305 310 315
 Ser Arg Asn Glu Arg Tyr Gln Ala Glu Gly Tyr Arg Arg Trp Gly
 320 325 330
 Arg Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Ser Asp Ala Gly Ser Ser Val
 335 340 345
 Gly Arg Arg Arg Arg Thr Leu Ser Glu Ser Ser Ala Trp Glu Ser
 350 355 360
 Val Ser Ser His Asp Ile Trp Val Leu Lys Gln Gln Leu Glu Leu
 365 370 375
 Asn Arg Pro Asp His Gly Arg Arg Arg Arg Ala Asp Ser Met Ser
 380 385 390
 Ser Glu Ser Thr Trp Gly Arg Met Glu Arg Glu Ala Ala Gly Asp
 395 400 405

<210> 3
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 1437588CD1

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

WO 01/96546 PCT/US01/19442

185 190 195

Gln Val Leu Cys His
200

<210> 4
<211> 420
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7476861CD1

<400> 4
Met Ser Ser Pro Arg Asp Phe Arg Ala Glu Pro Val Asn Asp Tyr
1 5 10 15
Glu Gly Asn Asp Ser Glu Ala Glu Asp Leu Asn Phe Arg Glu Thr
20 25 30
Leu Pro Ser Ser Ser Gln Glu Asn Thr Pro Arg Ser Lys Val Phe
35 40 45
Glu Asn Lys Val Asn Ser Glu Lys Val Lys Leu Ser Leu Arg Asn
50 55 60
Phe Pro His Asn Asp Tyr Glu Asp Val Phe Glu Glu Pro Ser Glu
65 70 75
Ser Gly Ser Asp Pro Ser Met Trp Thr Ala Arg Gly Pro Phe Arg
80 85 90
Arg Asp Arg Trp Ser Ser Glu Asp Glu Glu Ala Ala Gly Pro Ser
95 100 105
Gln Ala Leu Ser Pro Leu Leu Ser Asp Thr Arg Lys Ile Val Ser
110 115 120
Glu Gly Glu Leu Asp Gln Leu Ala Gln Ile Arg Pro Leu Ile Phe
125 130 135
Asn Phe His Glu Gln Thr Ala Ile Lys Asp Cys Leu Lys Ile Leu
140 145 150
Glu Glu Lys Thr Ala Ala Tyr Asp Ile Met Gln Glu Phe Met Ala
155 160 165
Leu Glu Leu Lys Asn Leu Pro Gly Glu Phe Asn Ser Gly Asn Gln
170 175 180
Pro Ser Asn Arg Glu Lys Asn Arg Tyr Arg Asp Ile Leu Pro Tyr
185 190 195
Asp Ser Thr Arg Val Pro Leu Gly Lys Ser Lys Asp Tyr Ile Asn
200 205 210
Ala Ser Tyr Ile Arg Ile Val Asn Cys Gly Glu Tyr Phe Tyr
215 220 225
Ile Ala Thr Gln Gly Pro Leu Leu Ser Thr Ile Asp Asp Phe Trp
230 235 240
Gln Met Val Leu Glu Asn Asn Ser Asn Val Ile Ala Met Ile Thr
245 250 255
Arg Glu Ile Glu Gly Ile Ile Lys Cys Tyr His Tyr Trp Pro
260 265 270
Ile Ser Leu Lys Lys Pro Leu Glu Leu Lys His Phe Arg Val Phe
275 280 285
Leu Glu Asn Tyr Gln Ile Leu Gln Tyr Phe Ile Ile Arg Met Phe
290 295 300
Gln Val Val Glu Lys Ser Thr Gly Thr Ser His Ser Val Lys Gln
305 310 315
Leu Gln Phe Thr Lys Trp Pro Asp His Gly Thr Pro Ala Ser Ala
320 325 330
Asp Ser Phe Ile Lys Tyr Ile Arg Tyr Ala Arg Lys Ser His Leu
335 340 345
Thr Gly Pro Met Val Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr
350 355 360
Gly Val Phe Leu Cys Val Asp Val Val Phe Cys Ala Ile Val Lys
365 370 375
Asn Cys Ser Phe Asn Ile Met Asp Ile Val Ala Gln Met Arg Glu
380 385 390
Gln Arg Ser Gly Met Val Gln Thr Lys Glu Gln Tyr His Phe Cys

WO 01/96546 PCT/US01/19442

395 400 405
 Tyr Asp Ile Val Leu Glu Val Leu Arg Lys Leu Leu Thr Leu Asp
 410 415 420

<210> 5
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5320695CD1

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

<210> 6
 <211> 622
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 8116710CD1

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

<400> 6
Met Asn Lys Leu Asn Phe His Asn Asn Arg Val Met Gln Asp Arg
1 5 10 15
Arg Ser Val Cys Ile Phe Leu Pro Asn Asp Glu Ser Leu Asn Ile
20 25 30
Ile Ile Asn Val Lys Ile Leu Cys His Gln Leu Leu Val Gln Val
35 40 45
Cys Asp Leu Leu Arg Leu Lys Asp Cys His Leu Phe Gly Leu Ser
50 55 60
Val Ile Gln Asn Asn Glu His Val Tyr Met Glu Leu Ser Gln Lys
65 70 75
Leu Tyr Lys Tyr Cys Pro Lys Glu Trp Lys Lys Glu Ala Ser Lys
80 85 90
Val Arg Gln Tyr Glu Val Thr Trp Gly Ile Asp Gln Phe Gly Tyr
95 100 105
Pro Met Ile Ile His Phe Arg Val Gln Tyr Tyr Val Glu Asn Gly
110 115 120
Arg Leu Ile Ser Asp Arg Ala Ala Arg Tyr Tyr Tyr Trp His
125 130 135
Leu Arg Lys Gln Val Leu His Ser Gln Cys Val Leu Arg Glu Glu
140 145 150
Ala Tyr Phe Leu Leu Ala Ala Phe Ala Leu Gln Ala Asp Leu Gly
155 160 165
Asn Phe Lys Arg Asn Lys His Tyr Gly Lys Tyr Phe Glu Pro Glu
170 175 180
Ala Tyr Phe Pro Ser Trp Val Val Ser Lys Arg Gly Lys Asp Tyr
185 190 195
Ile Leu Lys His Ile Pro Asn Met His Lys Asp Gln Phe Ala Leu
200 205 210
Thr Ala Ser Glu Ala His Leu Lys Tyr Ile Lys Glu Ala Val Arg
215 220 225
Leu Asp Asp Val Ala Val His Tyr Tyr Arg Leu Tyr Lys Asp Lys
230 235 240
Arg Glu Ile Glu Ala Ser Leu Thr Leu Gly Leu Thr Met Arg Gly
245 250 255
Ile Gln Ile Phe Gln Asn Leu Asp Glu Glu Lys Gln Leu Leu Tyr
260 265 270
Asp Phe Pro Trp Thr Asn Val Gly Lys Leu Val Phe Val Gly Lys
275 280 285
Lys Phe Glu Ile Leu Pro Asp Gly Leu Pro Ser Ala Arg Lys Leu
290 295 300
Ile Tyr Tyr Thr Gly Cys Pro Met Arg Ser Arg His Leu Leu Gln
305 310 315
Leu Leu Ser Asn Ser His Arg Leu Tyr Met Asn Leu Gln Pro Val
320 325 330
Leu Arg His Ile Arg Lys Leu Glu Glu Asn Glu Glu Lys Lys Gln
335 340 345
Tyr Arg Glu Ser Tyr Ile Ser Asp Asn Leu Asp Leu Asp Met Asp
350 355 360
Gln Leu Glu Lys Arg Ser Arg Ala Ser Gly Ser Ser Ala Gly Ser
365 370 375
Met Lys His Lys Arg Leu Ser Arg His Ser Thr Ala Ser His Ser
380 385 390
Ser Ser His Thr Ser Gly Ile Glu Ala Asp Thr Lys Pro Arg Asp
395 400 405
Thr Gly Pro Glu Asp Ser Tyr Ser Ser Ser Ala Ile His Arg Lys
410 415 420
Leu Lys Thr Cys Ser Ser Met Thr Ser His Gly Ser Ser His Thr
425 430 435
Ser Gly Val Glu Ser Gly Gly Lys Asp Arg Leu Glu Glu Asp Leu
440 445 450
Gln Asp Asp Glu Ile Glu Met Leu Val Asp Asp Pro Arg Asp Leu
455 460 465
Glu Gln Met Asn Glu Glu Ser Leu Glu Val Ser Pro Asp Met Cys
470 475 480
Ile Tyr Ile Thr Glu Asp Met Leu Met Ser Arg Lys Leu Asn Gly
485 490 495

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

His Ser Gly Leu Ile Val Lys Glu Ile Gly Ser Ser Thr Ser Ser
 500 505 510
 Ser Ser Glu Thr Val Val Lys Leu Arg Gly Gln Ser Thr Asp Ser
 515 520 525
 Leu Pro Gln Thr Ile Cys Arg Lys Pro Lys Thr Ser Thr Asp Arg
 530 535 540
 His Ser Leu Ser Leu Asp Asp Ile Arg Leu Tyr Gln Lys Asp Phe
 545 550 555
 Leu Arg Ile Ala Gly Leu Cys Gln Asp Thr Ala Gln Ser Tyr Thr
 560 565 570
 Phe Gly Cys Gly His Glu Leu Asp Glu Glu Gly Leu Tyr Cys Asn
 575 580 585
 Ser Cys Leu Ala Gln Gln Cys Ile Asn Ile Gln Asp Ala Phe Pro
 590 595 600
 Val Lys Arg Thr Ser Lys Tyr Phe Ser Leu Asp Leu Thr His Asp
 605 610 615
 Glu Val Pro Glu Phe Val Val
 620

<210> 7
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 5370008CD1

<400> 7
 Met Cys Cys Ser Glu Arg Leu Pro Gly Leu Pro Gln Pro Ile Val
 1 5 10 15
 Met Glu Ala Leu Asp Glu Ala Glu Gly Leu Gln Asp Ser Gln Arg
 20 25 30
 Glu Met Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Pro Ser Asp Pro Ala
 35 40 45
 Gln Lys Pro Pro Pro Arg Gly Ala Gly Ser His Ser Leu Thr Val
 50 55 60
 Arg Ser Ser Leu Cys Leu Phe Ala Ala Ser Gln Phe Leu Leu Ala
 65 70 75
 Cys Gly Val Leu Trp Phe Ser Gly Tyr Gly His Ile Trp Ser Gln
 80 85 90
 Asn Ala Thr Asn Leu Val Ser Ser Leu Leu Thr Leu Leu Lys Gln
 95 100 105
 Leu Glu Pro Thr Ala Trp Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Val Pro
 110 115 120
 Ser Leu Leu Leu Val Phe Leu Ser Val Gly Leu Val Leu Val Thr
 125 130 135
 Thr Leu Val Trp His Leu Leu Arg Thr Pro Pro Glu Pro Pro Thr
 140 145 150
 Pro Leu Pro Pro Glu Asp Arg Arg Gln Ser Val Ser Arg Gln Pro
 155 160 165
 Ser Phe Thr Tyr Ser Glu Trp Met Glu Glu Lys Ile Glu Asp Asp
 170 175 180
 Phe Leu Asp Leu Asp Pro Val Pro Glu Thr Pro Val Phe Asp Cys
 185 190 195
 Val Met Asp Ile Lys Pro Glu Ala Asp Pro Thr Ser Leu Thr Val
 200 205 210
 Lys Ser Met Gly Leu Gln Glu Arg Arg Gly Ser Asn Val Ser Leu
 215 220 225
 Thr Leu Asp Met Cys Thr Pro Gly Cys Asn Glu Glu Gly Phe Gly
 230 235 240
 Tyr Leu Met Ser Pro Arg Glu Glu Ser Ala Arg Glu Tyr Leu Leu
 245 250 255
 Ser Ala Ser Arg Val Leu Gln Ala Glu Glu Leu His Glu Lys Ala
 260 265 270
 Leu Asp Pro Phe Leu Leu Gln Ala Glu Phe Phe Glu Ile Pro Met
 275 280 285

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

Asn Phe Val Asp Pro Lys Glu Tyr Asp Ile Pro Gly Leu Val Arg
290 295 300
Lys Asn Arg Tyr Lys Thr Ile Leu Pro Asn Pro His Ser Arg Val
305 310 315
Cys Leu Thr Ser Pro Asp Pro Asp Asp Pro Leu Ser Ser Tyr Ile
320 325 330
Asn Ala Asn Tyr Ile Arg Gly Tyr Gly Gly Glu Glu Lys Val Tyr
335 340 345
Ile Ala Thr Gln Gly Pro Ile Val Ser Thr Val Ala Asp Phe Trp
350 355 360
Arg Met Val Trp Gln Glu His Thr Pro Ile Ile Val Met Ile Thr
365 370 375
Asn Ile Glu Glu Met Asn Glu Lys Cys Thr Glu Tyr Trp Pro Gln
380 385 390
Glu Gln Val Ala Tyr Asp Gly Val Glu Ile Thr Val Gln Lys Val
395 400 405
Ile His Thr Glu Asp Tyr Arg Leu Arg Leu Ile Ser Leu Lys Ser
410 415 420
Gly Thr Glu Glu Arg Gly Leu Lys His Tyr Trp Phe Thr Ser Trp
425 430 435
Pro Asp Gln Lys Thr Pro Asp Arg Ala Pro Pro Leu Leu His Leu
440 445 450
Val Arg Glu Val Glu Glu Ala Ala Gln Gln Glu Gly Pro His Cys
455 460 465
Ala Pro Ile Ile Val His Cys Ser Ala Gly Ile Gly Arg Thr Gly
470 475 480
Cys Phe Ile Ala Thr Ser Ile Cys Cys Gln Gln Leu Arg Gln Gln
485 490 495
Gly Val Val Asp Ile Leu Lys Thr Thr Cys Gln Leu Arg Gln Asp
500 505 510
Arg Gly Gly Met Ile Gln Thr Cys Glu Gln Tyr Gln Phe Val His
515 520 525
His Val Met Ser Leu Tyr Glu Lys Gln Leu Ser His Gln Ser Pro
530 535 540
Glu

```

```

<210> 8
<211> 321
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3016191CD1

```

```

<400> 8
Met Ala Ala Ala Glu Ala Gly Gly Asp Ala Arg Cys Val Arg
1 5 10 15
Leu Ser Ala Glu Arg Ala Gln Ala Leu Leu Ala Asp Val Asp Thr
20 25 30
Leu Leu Phe Asp Cys Asp Gly Val Leu Trp Arg Gly Glu Thr Ala
35 40 45
Val Pro Gly Ala Pro Glu Ala Leu Arg Ala Leu Arg Ala Arg Gly
50 55 60
Lys Arg Leu Gly Phe Ile Thr Asn Asn Ser Ser Lys Thr Arg Ala
65 70 75
Ala Tyr Ala Glu Lys Leu Arg Arg Leu Gly Phe Gly Gly Pro Ala
80 85 90
Gly Pro Gly Ala Ser Leu Glu Val Phe Gly Thr Ala Tyr Cys Thr
95 100 105
Ala Leu Tyr Leu Arg Gln Arg Leu Ala Gly Ala Pro Ala Pro Lys
110 115 120
Ala Tyr Val Leu Gly Ser Pro Ala Leu Ala Ala Glu Leu Glu Ala
125 130 135
Val Gly Val Ala Ser Val Gly Val Gly Pro Glu Pro Leu Gln Gly
140 145 150

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Glu Gly Pro Gly Asp Trp Leu His Ala Pro Leu Glu Pro Asp Val
 155 160 165
 Arg Ala Val Val Val Gly Phe Asp Pro His Phe Ser Tyr Met Lys
 170 175 180
 Leu Thr Lys Ala Leu Arg Tyr Leu Gln Gln Pro Gly Cys Leu Leu
 185 190 195
 Val Gly Thr Asn Met Asp Asn Arg Leu Pro Leu Glu Asn Gly Arg
 200 205 210
 Phe Ile Ala Gly Thr Gly Cys Leu Val Arg Ala Val Glu Met Ala
 215 220 225
 Ala Gln Arg Gln Ala Asp Ile Ile Gly Lys Pro Ser Arg Phe Ile
 230 235 240
 Phe Asp Cys Val Ser Gln Glu Tyr Gly Ile Asn Pro Glu Arg Thr
 245 250 255
 Val Met Val Gly Asp Arg Leu Asp Thr Asp Ile Leu Leu Gly Ala
 260 265 270
 Thr Cys Gly Leu Lys Thr Ile Leu Thr Leu Thr Gly Val Ser Thr
 275 280 285
 Leu Gly Asp Val Lys Asn Asn Gln Glu Ser Asp Cys Val Ser Lys
 290 295 300
 Lys Lys Met Val Pro Asp Phe Tyr Val Asp Ser Ile Ala Asp Leu
 305 310 315
 Leu Pro Ala Leu Gln Gly
 320

<210> 9
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7476860CD1

<400> 9
 Met Thr Ser Ile Pro Phe Pro Gly Asp Arg Leu Leu Gln Val Asp
 1 5 10 15
 Gly Val Ile Leu Cys Gly Leu Thr His Lys Gln Ala Val Gln Cys
 20 25 30
 Leu Lys Gly Pro Gly Gln Val Ala Arg Leu Val Leu Glu Arg Arg
 35 40 45
 Val Pro Arg Ser Thr Gln Gln Cys Pro Ser Ala Asn Asp Ser Met
 50 55 60
 Gly Asp Glu Arg Thr Ala Val Ser Leu Val Thr Ala Leu Pro Gly
 65 70 75
 Arg Pro Ser Ser Cys Val Ser Val Thr Asp Gly Pro Lys Phe Glu
 80 85 90
 Val Lys Leu Lys Lys Asn Ala Asn Gly Leu Gly Phe Ser Phe Val
 95 100 105
 Gln Met Glu Lys Glu Ser Cys Ser His Leu Lys Ser Asp Leu Val
 110 115 120
 Arg Ile Lys Arg Leu Phe Pro Gly Gln Pro Ala Glu Glu Asn Gly
 125 130 135
 Ala Ile Ala Ala Gly Asp Ile Ile Leu Ala Val Asn Gly Arg Ser
 140 145 150
 Thr Glu Gly Leu Ile Phe Gln Glu Val Leu His Leu Leu Arg Gly
 155 160 165
 Ala Pro Gln Glu Val Thr Leu Leu Leu Cys Arg Pro Pro Pro Gly
 170 175 180
 Ala Leu Pro Glu Leu Glu Gln Glu Trp Gln Thr Pro Glu Leu Ser
 185 190 195
 Ala Asp Lys Glu Phe Thr Arg Ala Thr Cys Thr Asp Ser Cys Thr
 200 205 210
 Ser Pro Ile Leu Asp Gln Glu Asp Ser Trp Arg Asp Ser Ala Ser
 215 220 225
 Pro Asp Ala Gly Glu Gly Leu Gly Leu Arg Pro Glu Ser Ser Gln
 230 235 240

WO 01/96546

PCT/US01/19442

Lys	Ala	Ile	Arg	Glu	Ala	Gln	Trp	Gly	Gln	Asn	Arg	Glu	Arg	Pro
				245					250					255
Trp	Ala	Ser	Ser	Leu	Thr	His	Ser	Pro	Glu	Ser	His	Pro	His	Leu
				260					265					270
Cys	Lys	Leu	His	Gln	Glu	Arg	Asp	Glu	Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	Ser
				275					280					285
Leu	Glu	Lys	Asp	Val	Arg	Gln	Asn	Cys	Tyr	Ser	Val	Cys	Asp	Ile
				290					295					300
Met	Arg	Leu	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Arg	Leu
				305					310					315
Ser	Thr	Asp	Ile	Phe										
				320										

<210> 10
 <211> 1803
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 8124196CB1

```

<400> 10
cgagtgccgga ctggccggat ctgctgtcag tcagogggaa cagactcttc cctctccatc 60
tggtcaactg cgggagaaaa attttcgaga atttccagca ggcaaggcag tggccgcttt 120
gactgcttgc ttcggagatc cgagacgacg gagaaggcac tcttatttac cgaccaagaa 180
agctcctccc ccggctcctcc ggttagctaa tttaaacatt ttccaggcac gtaggccatcc 240
agagcaactc cactatctgt ccattgacct ttccctcctc actgagtcct ttggagctga 300
gtttgtcaaa cagctgcctt aatcacttgg ctccagagtg gtgggaacca ggtgagaagg 360
agagtgctgc taagctcccg cctgctgcag gacgacaggr ggtgacacc ggtgacacc 420
agctccaact cagagcctag gtgttctcgg ttgaccocag atggtagtgg gagtccagct 480
acctgggaca attttgggat ctgggataac cgcattgatg agccaattct gctgccacc 540
agcattaagt atggcaagcc aatcccaaaa atcagcttgg aaaaatgggg gtgcgctca 600
cagattggca aacggaaaaga gaatgaagat cggtttgaat tgcctcagct gacagatgag 660
gtcctgtact ttgcagtgtg tgatggacac ggtggacctg cagcagctga tttctgtcat 720
accacaactg agaaaigtat tatggatttg ctctcaagg agaagaactt ggaactctg 780
ttgacctgg attttcaga aatagataaa gccctttcga gtcaatgccg cctgtctgct 840
gatgcaactc ttctgacctc tgggactact gcaacagttag cctatttgcg agatggtatt 900
gaactggttg tagccagtgt tggggacagc cgggctattt tgtgtagaaa aggaaaacc 960
atgaagctga ccattgacca tactccagaa agaaaagatg aaaaagaag gatcaagaaa 1020
tgtgtgggtt ttgtagcttg gaatagtttg gggcagcttc acgtaaatgg caggcttga 1080
atgacaagaa gtattggaga tttggacctt aagaccagtg gtgtcatagc agaactgaa 1140
actagagaga tcaagttaca tcatgtctgat gacagctccc tggctctcac cacagatgga 1200
atbaacttca tgggtgaatg tcaagaatt ttgtgacttg tcaatcagtg catgatccc 1260
aacgaagcag cccatgctgt gactgaacag gcaatacagt acggtactga ggataacagt 1320
actgcagttag tagtgctctt tggctcctgg ggaataata agaactctga aatcaactc 1380
tcattcagca gaagctttgc ctccagtgga cgtatggcct gattaccagc tgggacttag 1440
agtttctgtg caacagtttt tcaactgagca tgtcaagaaa ctgataagat caaaaaggtc 1500
tcctaactca ctagatcagc gcacaagtca gtgtaacca cttagatagt agttttttca 1560
taaatgtcca tcaatattat gttccgctgt acatgtctcag tataaataata tgtgtagtga 1620
agctactctg agtctttaaa tggaaaagag aatatgagag tggtttggat acacttgaag 1680
agagatgaga gtgtcacatt aataagtttt taagactctt aggcagctat gggtttcttt 1740
tgatcatttt tgttctttat tcaattgtac acgttttttg gggatcacta gttatgaaag 1800
gcc
  
```

<210> 11
 <211> 1329
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7473604CB1

```

<400> 11
atgctggagt ctgctgaaca gctgctggtg gaggaacctgt acaaccgcgt cagggagaag 60
atggatgaca ccagctctca taatacyccc tgtgtctctgg acctacagcg ggccttgggt 120
  
```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

caggatcgcc aagaggcgcc ctggaatgag gtggatgagg totggcccaa tgtttcata 180
gctgacagga gtgtggctgt gaacaagggg aggtggaaga ggctgggaat caccacatt 240
ctgaaatgctg cgcattggcac cggcgtttac actggccccc aattctacac tggcctggag 300
atccagttacc tgggtgtaga ggtggatgac ttctctgagg tggacatttc ccagcatttc 360
cggaggcgt actgtcatta catcatttcc tctgtgttt tcaittcagg gaaagtcccg 420
gtcagcagcg aatggggcat cagccggtea gcagtgtgg tggctgccta cctgatgatc 480
ttccacacaa tggccatcct ggagcctttg atgaccgtgc gtaagaagcg ggccatctac 540
cccaatgagg gtttctgaa gcagctgagg gaggctcaat agaagttgat ggaggagaga 600
gaagaggact atggccggaa ggggggata gctgagctg aggaggcga gggcactggg 660
agcatgctcg gggccagagt gcacgccctg acggtggaag aggaggacya cagcgcagc 720
caactgagtg gtcctcctcc ggggaaggcc acccaggcct ccaagccctc caccctcata 780
gacgaggagg aggaggagaa actgtacgag cagtggaaga agggcaggg cctcctctca 840
gacaaggtcc ccagagatgg aggtgctgg cgtcagcct cctctggca ggtggggag 900
gagctcgagg accagagcgt ggagaggatc atccaggagt ggcagagcc aaacgagagg 960
taccaaagcag aagggtaccg gagggtggga agggaggagg agaagagga ggagagcgac 1020
gctggctcct cgttggggag gcggcggcgc accctgagcg agagcagcg cttgggagag 1080
gtgagcagcc acgacatctg ggtcctgaag cagcagctgg agctgaacc cccggaccac 1140
ggcaggaggg cccgcgcaga ctgatgtcc tcggagagca cctgggagc catggaaaca 1200
gaggctgctg gacattgaga agyaggcttc ccgagtgta ccaagccaag agcaagagag 1260
agggagcgac agacagagag ttcagaagca ggaaccagg gtcggggaag gatgatgagg 1320
actgcgaa

```

```

<210> 12
<211> 1236
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 1437588CB1

```

```

<400> 12
cctctctccc cgcgcgggac tggggcctc tagggaaaga gcctgccatt tggggatgag 60
agcagtttgc ccatatacac acacttttat acgtgtgtgt gttggggag ggggtgggg 120
atggctgctc gcgctgctct gtabgtgtct gtgtatgttc gaatgtgat gtgggggca 180
tgaagggaaa tgbatgtccc ggtgtgctct ccgcacatlc ctgagacctg tctcaggtca 240
ggaggactgg ctgagagatc ctcttctctc ggccagccca tgggtctctc acccgttctc 300
gtcccaagctc tccggggctg ggtctgaaag gcctcaccgc cctctgttc cctcaggggt 360
ggcctgtgag agatcttctc ctacctgttc ctgggagcct gcagtcaact gtcagacctg 420
caggggctgc aggcctgtgg catcacagcc gtcctcaacy tgcgcgcaag ctgcccaca 480
caacttgagg gcctttctcg ctacaagagt atccctgtgg aggacaacca gatggtggag 540
atcagttgct gtttccagga ggcctaggg ttcattgact gggtaagaa cagcggaggc 600
cgggtgttgg tgcactgcca ggcgggtatc tgcgctctg ccacacatct tctgcaatc 660
ctcatcaga gtccctgtgt cggctgggac gaggcctttg acttctgtaa gcaggccgg 720
ggggtcaact ccccacactt cagtttcatg gggcagctgc tgcagtttga gaccagctg 780
ctgtgtcaact gagggtgtgc cctctgctc gcctgcccc ctgtgtctgg aggagctgac 840
tgtggactgg tgggtcccc tctgggcca cagctcccc tcaactctgg cagggtgct 900
accctctcag agtttcagaa gcccccacat gggggtctca ggaatgccgg catgctgctc 960
ttccagactt gtttctcttc tgcctgggga ctgaggctgg cctcattcty gggctgggaa 1020
ccgaggggtg gctgtctctt tccctcccca tctctgtgga gaaatcagct agagctaba 1080
ccgtggactc tccctggtcc accacatgt tgaagcctt ggcagcctga gagctcaag 1140
gaacaagctg tgacaaccag gaggcctgtc tgtgggttc tctgcccagg gctggagcc 1200
caagcctctg gttcctgggg aagctgggga cttggg

```

```

<210> 13
<211> 1314
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 7476861CB1

```

```

<400> 13
aattcgctc ggcgtggac ccaactggcg aggtctgctg ggttgcagcg ggcagattgg 60
ggcggcccg cagggccag tgaacaaaa ttgtttgctg gcccccagga tactaactag 120
acccttggcc tgaactcacg gaaactaagg ctctttttct gaagaagcct ttaccagtc 180

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

tcaattaggg gatgggaaca acatgtcttc acotagggac tttagagcag agcctgtaaa 240
cgattatgag ggaatgact ctgaagcaga agacttgaat ttcagggaga ctttgccttc 300
atcaagttag gaaaacacac ctgatcaaaa ggttttttaa aataaagtta attcagagaa 360
ggtaaaaact tctcttcgga atttcccaca taatgattat gaggatgttt ttgaagagcc 420
ttcagaaaat ggcagtgatc ccagcatgtg gacagccaga ggcctcttca gaagagacag 480
gtggagcagt gaggatgagg aggtgtaggg ggcctcacag gctctctccc ctctacttcc 540
tgatacggcg aaattgttt ctgaagagag acatagatcg ttggetcaga ttcggccatt 600
aatattcaat ttctatgagc agacagccat caaggattgt ttgaaaatcc ttgaggaaaa 660
aacagcagcg tatgatata tgcaagattt tatggcttta gaacttaaga atctgctcgg 720
tgagttcaac tctgggaatc aaccaagcaa cagagaaaaa aacagatacc gagatattct 780
tccatgatgt tcaacacgcy ttctctctgg aaaaagcaag gactacatca atgctagtta 840
tattagaata gtcaattgtg gagaagagta tttttatctc gctactcaag gaccactgct 900
gagcaccata gatgactttt ggcacatcgtt gttggaaaat aattcaaatg ttatctgcat 960
gatataccaga gaggatagag gtggaaatct caaatgctac catlactggc caattctct 1020
gagaagacca ttggaattga ttcaactctcg tttatctctg gagaactacc agtacttcca 1080
atatttcatc attcgaatgt tcaagttgtt ggagaagctc accggaacta gtcactctgt 1140
aaaaacagtt cagttcacca agtggccaga ccattggcact cctgctcag cagatagctt 1200
cataaaatat attcgttatg caaggagag ccacottaca ggaccatgg ttgttcaact 1260
cagtgcocgg ataggccgga caggggtgtt cctatgtgtg gatgtcgtgt tctgtccat 1320
cgtaagaaac tgttcaattca acatcatgga tatagtggcc caaatgagag aacaacgttc 1380
tggcagtggt caaacgaagg agcagtatca ctttctgtac gatattgtgc ttgaagtct 1440
tcgtaaaact ctgactttgg attaagaagc actctctctg cctctcact gaattctct 1500
agtgggtttg caactctcca taaagaacat gtttgcactg tctgaaggg ctttgcctat 1560
catacaactc gctttctctg ttatcagttt tattttcttt ctaaaagctc cctgaaggg 1620
aatacatctt ggcctgggggt gatcagttt taactattga tcttctaga caatatcaaa 1680
ataactctcc acattttcca gtgaacaga tgttacataa aacgattgca gcttggctat 1740
tgggtggaag ggattacaga gcccaataaa gatttaana tatattcatt aagattttat 1800
ttggaaggtt ggcctggagag agctgaggat ttccaggact ttglaagttc ttattctagg 1860
agaacataag gccacataatc atgacctctt ccaggcattt ttaagacaga tgtc 1914

```

<210> 14

<211> 1263

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Incyte ID No: 5320695CB1

<400> 14

```

gogatctagc tetcccgat ttctctccc acccctgtgc agtctcact ccccgcgag 60
cgtctctctt ttctctgctt tgcctcggcg agcagagctt gagctogagc tggttctctg 120
tatagaagac gacggccgag gtatggagcc catgaaacta gacaacggcg gctgcggagg 180
cctgtagcgc cagctgagac agctgatgca gtgcgcggcg ctgcgcgagc aaggggttaa 240
ggcactgtgc gagaagcca aggagatatt gatggaggaa agcaactctc agcctgtaaa 300
gagtcagctg acaatattgt gtgatataca tggcaactc catgatcttg tagagctttt 360
ccgaattggc gggaaattgtc cagacaccaa ttacttatt atggagatt atgtagatcg 420
tggctactat tctgttgaga ctgtcacgat gctagttagc ctaaaagta ggtatccaca 480
tcgaattaca atctctctgt gaaaccacga gactggcag atcaacacag tttatggatt 540
ctacgacgaa tgcctacgaa agtatggcaa tgcacatgta tggaaacat ttacggatct 600
ttttgatgat ttctctctga cagctctggt ggaactctgag attttctgcc ttccaggctg 660
tctactctca tcaattgaaa atcttgatag tgtgagcagc ttgatctcag tccaagaggt 720
tcccactgag ggacctatgt cgcactctct atggtcagat ccagagccag gatgtggttg 780
ggycatctcc cctcggcgtg ctggctacac ttctgggcag gacatctcag agcagtttaa 840
tcacacaaac aatctcaaac tctgtactcg gctctcaaa ttagtattag agggatataa 900
ctgggctcat gagcaaaaag ttgtcaccaat atctagtgct ccaaatctact gctatcgatg 960
cggcaatagc gcatccattt tggaaattga ctagctcaac agccacacat tcatccagtt 1020
tgaaccagcc cctaggagag gtgagccaga tgtgagcgya agaaccagc attattctct 1080
ttgagctgtc gatgttacg ttcccagcc tgtgtcgtga taatcagtg caacgtctgc 1140
tggatcaagg gccagacaga aataacaggg gaatgcccga gcactatgac cagagttcca 1200
cccttttcaag ccgacagaga agggcggcca tccaactaca actctggcgc cctctggttt 1260
tat 1263

```

<210> 15

<211> 2278

<212> DNA

<213> Homo sapiens

WO 01/96546

PCT/US01/19442

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 8116710CB1

<400> 15
agcgaaggca gtgeaceget ctccgectct ttctggggct tcttctegct cctttagctc 60
tgggtgtcgg gcaccggctgc tatgaaaccc acgtgatfca acaccgtgat gcttctctcg 120
cagggggtgt gatgaggagg ogagcttggc ttggagctgc tgggaacctg aggaattgac 180
aaggacccoag agcccagccc tgaccaccag agtgcocaaa acacaatgaa caaattgaa 240
tttcataaca acagagtcac gcaagaccgc cgcagtgtgt gcattttcct tcccacgat 300
gaatctctga acatcatcat aaatgttaag attctgtgtc accagttgct ggtccaggtt 360
tgtgacctgc tcaaggctaaa ggaactgccc ctctttggac tcagtgttat acaaaaata 420
gaacatgtgt atattggagt gtcacaaaag ctctcaaat atgtccaaa agaattgagg 480
aaagsggcca gcaaggtacg acaatacga gtcacttggg gtatcgacca atttgggct 540
cctatgatca tccactcccg tgtgcagtac tatgtgaaa atggcagatt gatcagtgac 600
agagcagcaa gatactatta ttactggcac ctgaaaaaac aagttcttca ttctcagtt 660
gtctccagag aggagggcta ctctctgctg gcagcctttg cctgcagcg tgatcttggg 720
aactcaaaa ggaataagca ctatggaaaa tactctgagc cagaggtcta ctcccatct 780
tgggtgtttt ccaagagggg gaaggactac atcctgagc acattcaaaa catgcaaaa 840
gatcagtttg cactaacagc ttccgaagct catcttaaat atatcaaaa ggctgtccga 900
ctggatgacg tgcctgttca ttaclacaga ttgtctaaag ataaaagggg aattgagca 960
tcgtgaetct ttggatgtac catgagggga atacagatt ttcgaattt agatgaagag 1020
aaaaaatfac ttatgatatt cccctggaca aatgttggaa aattgtgttt tgtgggtaag 1080
aaatttgaga ttttgccaga tggcttgctc tctgccgga agctcatata ctacacgggg 1140
tgccccatgc gctccagaca cctcctgcaa ctcttgagca acagccacc cctctatgt 1200
aatctgcagc ctgtcctgcg ccataccgg aagctggagg aaaaagaa gaagaagcag 1260
taccgggaat cttacatcag tgacaacctg gacctgaca tggaccagct ggaaaaacgg 1320
tcgcyggcca gcgggagcag tgcggggcagc atgaaacaca agccctgtc cgtcatctc 1380
accgccaagc acagagttc caaacacctg ggcattgagc cagacaacag gcccggac 1440
accggccagc aagaacagca ctccagcagt gccatccacc gcaagctgaa aacctgcagc 1500
tcaatgacca gtcatggcag ctcccaacc tcaggggtgg agagtggcgg caaagaccgg 1560
ctggaagagg acttacagga cgtatgaaata gagatgttgg ttgatgacc cggggtctg 1620
gagcagatga atgaagagtc tctggaagtc agcccagaca tgtgatcta catcacagag 1680
gacatgctca tgtcgcggaa gctgaatgga cactctgggt tgatttgtaa agaaattggg 1740
ttctccact cyagctcttc agaaacagtt gtttaagctc ttggccagag tactgatct 1800
cttcccaga ctatgtctg gaaacaaag acctccactg atgacaagc ctgtgagctc 1860
gatgaactca gacttbacca gaaagaactt ctgctgattg caggtctgtg tcaggaoact 1920
agttcagatt acacccttgg atgtggccat gaactggatg aggaaggcct ctatlgcaac 1980
agttcttgg cccagcagtg catcaacatc caagtgctt ttccagtaaa aagaaccagc 2040
aaatactttt ctotggatct cactcatgat gaagttccag agtttgggt gtaagtcg 2100
ctgtgtgtca gctgtacagg cagcttactg ttgtctagag gatgccaag tcataagttc 2160
tttaacatct acttgtgcca tatctctctc accctaaaca tagctcttct tttataatat 2220
tgtgatgat ggaacaaaa gccttgyaac aattgcact taagtattac acagaagt 2278

<210> 16
<211> 2904
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 5370008CB1

<400> 16
ggtcggcgca gggagcgcgc acggagcgcg ggacggagcg ccaggcggac ggaccgaaag 60
accgaggcac cgaaggacgg accgcccgcg acacgcagac gcacagagct cggcgcggcc 120
cccctegcat acacacttgc acagacacaa gcagggaacac acgcagacac acgcacactc 180
gcgcgcgat cctcccgcga gcttcccgcg ctgtctgccc gcgcccggag cccgtctgg 240
ccggagtgaag agagagaacc accgtgctga tgnctccagg ggaaggggccc tggacaatgg 300
ctcaggtgag aggtcaccgg gtctcccaca gccgatagtg atggaggcac tggacagggc 360
tgaaggctc caggaactcac agagagagat gccgcccacc cctcctcctc gcgcgcccct 420
agatccagct cagaagccac cactctgagg cctctgggag cactccctca ctgtcaggag 480
cagcctgtgc ctgtctgctg cctcaacagtt cctgcttggc tgtggggctc tctggttcag 540
cgtttatggc cacatctggc cacagaacgc cacaaacctc gtctcctctt tctgtacgct 600
cctgaaacag ctggaaccca cygctctggc tgaactctgg acgtggggag tcccagctct 660
gctctgtgtc ttctgtccg tggccttggc cctctgtacc accctgtgtt ggcacctct 720
gaggacaacc ccagagccac ccccccact gccctctgag gacaggggcc agtctagtg 780

WO 01/96546

PCT/US01/19442

```

cggccagccc tcttcaact actcagagt gatggaggag aagatcgagg atgacttcc 840
ggactctgac cgggtgccc agactcctgt gtttgatgt gtgatggaca tcaagcctga 900
ggctgacccc acctcaacta cgtcaagtc catgggtctg caggagagga ggggttccaa 960
tgtctccctg accctggaca tgtgcactcc gggctgcaac gaggagggct ttggctabct 1020
caltgtccca cgtgaggagt ccgcccgcga gtacctgtcc agccctccc gttgctctca 1080
agcagaagag ctcaatgaaa aggccttggc cccttctctg ctgaaggcgy aatctttga 1140
aatccccatg aactttgttg atccgaaaga gtacagatc cctgggtctg tgcggaaga 1200
cggltacaaa accatacttc ocaaccctca cagcagagt tgtotgacct caccagacc 1260
tgagccact ctgagtctct acatcaatgc caactcaatc cggggtatg gttgggggga 1320
gaagggtatc atcgccactc agggaccatc cytcagcagc gtcgcccact tctggcgcac 1380
ggtgtggcag gaggcacagc ccactcattg catgatcaac aacatcgagg agatgaacya 1440
gaantgcacc gagtattggc cggaggagca gttggcgtac gacggtgttg agatcaactg 1500
cagagaagtc atccacacgg aggaltaccg gctgcgactc acctcccctc agagtgggac 1560
tggggagaga gtcctgaaag atactcgttc caactctctg ccgacccaga agactccaga 1620
cggggccccc ccactcctgc acctggtctg ggaggtggag gaggcaagcc agcaggagg 1680
gccccactgt gcccccactc tcttccactg cagtccagg atgtgggaga ccgctgtct 1740
cattgccacc agcatctgct gccagcagct gcggcaggag ggtgtgttg acatcctgaa 1800
gaccacgtgc cagctccctc aggcagggg cygcatgatc cagacatgag agcagtaaca 1860
gtttgtgacc cagctcaatga gcctctacga aaagcagctg tcccaccagt ccccaaatg 1920
actgctcttc tctcaaacgg tctctctggc actgcccagc ctgagctctg gccctcacc 1980
agggccctgc ctgggtctct gggcctgctc ccctctctc cccttcaagt cagctcctc 2040
tgtctctctg cagctggccc tgncccctac cctcagact tctctctctc actgtacata 2100
tggggagtg gggggcaggg tccggaagg acatgccagg ccaggcctgg gggcccggg 2160
ctgacccacc accacgcaga ccccggctc cagtttttaa cgtatgttcc atcaatacc 2220
gatccagaat gttccctgct tacactttgt gtcctgctgc aatgttctc gtcctccat 2280
ccactctctg cctctgtacc ggcaactgtg tctctcagc caggaaaggg taatgagctc 2340
cagccctcaa gcaaccggac ttgctctgct cggcctcacc cgaactctc ccaaaagca 2400
gagtgcgggg agttaggcat ggggagctcc agaaggtcac cagagagctc tcaagtggg 2460
gagagttctc gaggttgag ggggtgggag ggcctgggtg gctctgggtg tcaagtggg 2520
ctcaggaggg tgcccagcct gtaggcaact ggcaagtag gggcagatg gggcattggg 2580
aacccagagg atctagccc tgttggggag gggaggggag ctcaaggttt ggggtgggac 2640
tcagcccaga tctactgtg acatttttct gttgctact gggaaagct tcccagaagt 2700
ctcaactgct gttgctctgc gtgtgttccc atgtccatgc gtgtgttag agcccatcag 2760
gagggcagtc atgactcttt ggcaacatgt attatcttgg agccactgtt ttttatgtct 2820
gactttaaatt atttaccaca cggcagacag agacattctg tctctttta taattgctc 2880
ggtgtcattg aatagacaa taaa 2940

```

```

<210> 17
<211> 1289
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> misc_feature
<223> Incyte ID No: 3016191CB1

```

```

<400> 17
atggcggcgg cggaggccgg tggcgacgac gcccgctgcy tgcggctgag cggcagcgg 60
gcacagcggc tgcctggccga cgtggacaag ctgctgttcc actgcgacgg cgtctgttg 120
cggcggggaga ccgcccgtgc tggcggcccc gaggccctgc gggcgtctg agcccggcg 180
aagcgcctgg gcttctatcc caacaaagc agcaagacc ccgctgtcta cggcgagag 240
ctggcgcgcc tgggctctgg cggcccgcgg gggcccggcg ccagcctgga ggtcttggc 300
acggcctact gcaaccgctc ctaccctgctc cagcgcctg ccggcgcacc cggcaccag 360
gcctcactgc tggcagccc agccctggcc gggagctgg aggcctggg cgtgcagc 420
gtggcgttgg ggcccagacc actcagggc gaggatccc gcgactgct gcacgcgcc 480
ctggagcccc acgtgcgcgc ggtgtgtgtg ggtttgacc cgcactcaag ctacatgaag 540
ctcaccaggg cctctgccta cctgcagcag cccggctgccc tgcctgtgg caaccaatg 600
gacnacgggc ttoccttga gaacggccgc ttcactcgg gtaaccgggt tctgtctga 660
gocgtggaga tggcggccca ggcagggcc gaactatg ggaagccag ccgttcaat 720
tctgactgcy tgtcccagga atacggatc acccccagc gcaactcat gttgggagac 780
ccctgggaca cagacatct cctaggcgc acctgtgccc tgaagcaat cctgaccctc 840
accgagctct ccaactatgg gtagtgaag aataatcagg aaagtactg cgtgtcctaa 900
aagaaaaatg tccctgactt ctatgttgc agcatagccc acctttgccc tgccttcaa 960
ggttaaagat tgagtgtctt taatctcag aataaaaaaa aagaaattga aaaccagta 1020
ccaaattaa taggtggggc tlaagcatc gctcggctaa gttgctcaa agagttaat 1080
tggagttaag caaagcatt caltgttaac ctgttaagta cacgtttggg ggacatatt 1140
gtttacagat gcttgaatc gaagatgacc ttttagctt ggaaggcgtt gttggctgg 1200

```

WO 01/96546

PCT/US01/19442

tctctgggct	tgggtggggg	tggcagggc	aggctctgca	cctgtccggg	attcaggtaa	1260
ccagggcctg	ccgatggggc	tgaggcggg				1289

<210> 18
 <211> 1950
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Incyte ID No: 7476860CB1

<400> 18
 tgtgctcag aagaaggag tgagactgct cagagaggca ggattctctg tgactocagg 60
 gggacacctg gcacctcagc ttcctttccc acttctccag gctgcattga ggggtccggg 120
 gcaggggect cctggaaggg aacctctctg agcctcaagc accaggtcat gacatgacat 180
 ctatcccttt cccaggtgac cgactcctgc aggtggatgg agtgattctg tgcggctca 240
 cccacaagca ggctgtycag tgcttgaagg gtccctggca ggttgaaga ctggtcttag 300
 agagaagagt ccccaaggag acacagcagt gtctctctgc taatgacagc atgggagatg 360
 aagcgcagcc tgtttccctg gtaacagcct tgccctggcag gccctcgagc tgytctcag 420
 tgacagatgg tcttaagttt gaagtcacac taanaagaa tgcacaagg tgggattca 480
 gtttcgtgca gatggagaaa gagagctgca gccatctcaa aagtgatctt gtggagatta 540
 agaggtcttt tccggggcag ccagctgagg agaattggggc cattgcagct ggtgacatta 600
 tccctggcgt gaatggaagg tccacggaag gcctcatctt ccaggagggt ctgcatttac 660
 tgagaggggc ccaacaggaa gtcacgctcc tcccttggcg acccctccca ggtggctgc 720
 ctgagctgga gcaggaattg cagacacctg aactctcagc tgacaagaa ttcaccaggg 780
 caactgttac tgaactcatgt accagcccca tccctggata agaggacagc tggagggaca 840
 ggcctccc agatgcaggg gaaggcctgg gctcagacc agagtctcc caaaaggcca 900
 tccagagggc acaatggggc caaacagag agagaccttg gccagttcc ttgacacatt 960
 ctctctgagtc ccacctcat ttatgcaaac ttcaccaaga aagggatgaa tcaacattgg 1020
 cgactctttt ggaaaaggat gtgaggcaaa actgctattc agtttggat atcatgagac 1080
 ttggaagata ttcctctca tctctcttaa ccagacttc gacagattt tctgagcac 1140
 ctctctgca tgtctgcagt gctgtgtaaa atgcccacc tttgcatgga ctattcttc 1200
 taatcaagag gcgtgtgtgg cgaacttggg gcagcccctg gaagtcttgt tctttgaca 1260
 ttacgtctgc gctgcctca ccagataatg agcttcaaca ctgctctgcc tctgtgtcc 1320
 ttcoggggg agtaaatgtc actcaagctt gcagatctc taatagga aattttagt 1380
 gctcagaaaa ggcactgac tttgcacaaa gtgctttgat ggttgcctgc ttgagtact 1440
 ccaactcct tccgaaagcc ctttctttat aattctctg ttgaaatagc catcatattc 1500
 acagtactaa tcaacagcct tcaactttac taanaactta cccatacca ggaaccaga 1560
 gttggggggg ctgtgtcaga attatgtaat ttacgtgtcc caataatcct agacgttct 1620
 tgaccateta gttttgtcaa atgagaaaac tgaggttcca aagaagtcaa taaacttctc 1680
 caaagtctga ccgactctgc ttgcatgtg acgagctctg cttagaactg ggtcattgcc 1740
 ctgcttgcaa tgcctgtccc tctgcaagc ccccccacc cccggtctc ctgagctgg 1800
 taaggtgctc cagctgcttc taccataga ctctctacat ggactgtaac atttctttac 1860
 tgcctcaact tctcaataaa ttgggggctc ctcaaaaaac aaacagcaaa cagacaaac 1920
 accaagacaa ccaaccaaca cacaaaaaa 1950

【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
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096546 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/55, 9/16

(21) International Application Number: PCT/US01/19442

(22) International Filing Date: 14 June 2001 (14.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/212,447	16 June 2000 (16.06.2000)	US
60/213,746	22 June 2000 (22.06.2000)	US
60/215,210	29 June 2000 (29.06.2000)	US
60/216,529	6 July 2000 (06.07.2000)	US
60/218,080	12 July 2000 (12.07.2000)	US
60/220,117	21 July 2000 (21.07.2000)	US

[IN/US]: 1233 W. McKinley Avenue #3, Sunnyvale, CA 94086 (US). SANJANWALA, Madhu, S. [US/US]: 210 Sylvia Court, Los Altos, CA 94024 (US). STEWART, Elizabeth, A. [US/US]: 1767 Monticello Road, San Mateo, CA 94402 (US). TANG, Y., Tom [US/US]: 4230 Ramwick Court, San Jose, CA 95118 (US). THORNTON, Michael [US/US]: 9 Midway Road, Woodside, CA 94062 (US). TRIBOULEY, Catherine, M. [FR/US]: 1121 Tennessee Street #5, San Francisco, CA 94107 (US). WALLIA, Narinder, K. [US/US]: 890 Davis Street #205, San Leandro, CA 94577 (US). YANG, Junming [CN/US]: 7125 Bark Lane, San Jose, CA 95129 (US). YAO, Monique, G. [US/US]: 111 Frederick Court, Mountain View, CA 94043 (US). YUE, Henry [US/US]: 826 Lois Avenue, Sunnyvale, CA 94087 (US).

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

(71) Applicant (for all designated States except US): INCYTE GENOMICS, INC. [US/US]; 3160 Porter Drive, Palo Alto, CA 94304 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, ST, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): AU-YOUNG, Janice [US/US]; 233 Golden Eagle Lane, Brisbane, CA 94005 (US). BAUGHN, Mariah, R. [US/US]; 14244 Santiago Road, San Leandro, CA 94577 (US). DING, Li [CN/US]; 3353 Alma Street #146, Palo Alto, CA 94306 (US). ELLIOTT, Vicki, S. [US/US]; 3770 Polton Place Way, San Jose, CA 95121 (US). GANDHI, Ameena, R. [US/US]; 837 Roble Avenue #1, Menlo Park, CA 94025 (US). GRIFFIN, Jennifer, A. [US/US]; 33691 Mello Way, Fremont, CA 94555 (US). HABALIA, April [US/US]; 2227 Calle de Primavera, Santa Clara, CA 95054 (US). KEARNEY, Liam [IE/US]; 50 Woodside Avenue, San Francisco, CA 94127 (US). LEE, Ernestine, A. [US/US]; 624 Kains Street, Albany, CA 94706 (US). LI, Yan [CN/US]; 3885 Corrina Way, Palo Alto, CA 94303 (US). NGUYEN, Dannel, B. [US/US]; 1403 Ridgewood Drive, San Jose, CA 95118 (US). PATTERSON, Chandra [US/US]; 490 Sherwood Way #1, Menlo Park, CA 94025 (US). RAMKUMAR, Jayalaxmi [IN/US]; 34359 Maybird Circle, Fremont, CA 94555 (US). REDDY, Roopa

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
8 August 2002

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



WO 01/096546 A3

(54) Title: PROTEIN PHOSPHATASES

(57) Abstract: The invention provides human protein phosphatases (PP) and polynucleotides which identify and encode PP. 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 PP.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/19442
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/55 C12N9/16		
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, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 01 55301 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;ROSEN CRAIG A (US); BARASH STEVEN C (US) 2 August 2001 (2001-08-02) SEQ ID NO:930: 99.4% identity in 372 aa overlap (1-372:2-373) with SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:30: 99.5% identity in 1779 nt overlap (1-1779:33-1807) with SEQ ID NO:10. & DATABASE GENESEQ [Online] 17 December 2001 (2001-12-17) retrieved from GENESEQ Database accession no. AAS40804 abstract & DATABASE GENESEQ [Online] 18 December 2001 (2001-12-18) retrieved from GENESEQ Database accession no. AAU22934 abstract --- -/--	1-19,22, 25-45,54
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority 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 *I* 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. *S* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
12 February 2002	22. 05 2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5318 Patentsstrasse 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eps nl. Fax: (+31-70) 340-9016	Authorized officer Schmitz, T	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/19442

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MILLWARD T A ET AL: "Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, EN, vol. 24, no. 5, 1 May 1999 (1999-05-01), pages 186-191, XP004167918 ISSN: 0968-0004 cited in the application the whole document -----	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/19442
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 20, 21, 23, 24 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
1-44 (partially); 45, 54 (completely)	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 18 is 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 32, 34 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Claims 21 and 24 are directed to a method of treatment of the human/animal body. The search has not been carried out for the reasons given below.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 20, 21, 23, 24

Claims 20, 21, 23 and 24 refer to antagonists, agonists and ligands of the claimed polypeptides without giving a true technical characterisation thereof. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported (Articles 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such purely speculative claims whose wording is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 45, 54 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:1 (polypeptide) and SEQ ID NO:10 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

2. Claims: 46, 55 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:2 (polypeptide) and SEQ ID NO:11 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

3. Claims: 47, 56 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:3 (polypeptide) and SEQ ID NO:12 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

4. Claims: 48, 57 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:4 (polypeptide) and SEQ ID NO:13 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. Claims: 49, 58 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:5 (polypeptide) and SEQ ID NO:14 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

6. Claims: 50, 59 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:6 (polypeptide) and SEQ ID NO:15 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. Claims: 51, 60 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:7 (polypeptide) and SEQ ID NO:16 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

8. Claims: 52, 61 (completely), 1-44 (partially)

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:8 (polypeptide) and SEQ ID NO:17 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

9. Claims: 53, 62 (completely), 1-44 (partially)

International Application No. PCT/US 01/19442

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

An isolated, purified or recombinant protein phosphatase comprising SEQ ID NO:9 (polypeptide) and SEQ ID NO:18 (polynucleotide coding for said polypeptide);

Furthermore cells and transgenic organism containing said sequences, methods for producing said polypeptide, an antibody binding to said polypeptide, methods for producing said antibody, a method for detecting a target polynucleotide, a composition comprising said polypeptide. Methods for treating a disease comprising administering said polypeptide to a patient. A method for screening for an agonist / antagonist, a composition comprising said agonist / antagonist, a method for treating a disease comprising administering said agonist / antagonist to a patient. A method of screening for a compound that binds to said polypeptide, a method of screening for a compound that modulates the activity of said polypeptide, a method of screening for a compound that alters the expression of said polynucleotide, a method for assessing toxicity involving hybridising said polynucleotide, a diagnostic test involving an antibody against said polypeptide. A method of diagnosing a condition involving said antibody, a method of purifying said polypeptide.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/18	A 6 1 P 3/10		4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/06		4 C 0 8 4
A 6 1 P 5/06	A 6 1 P 5/14		4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 5/24		
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 7/00		
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/02		
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 7/04		
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/06		
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/10		
A 6 1 P 7/10	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/04		
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 9/10	1 0 1	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/14		
A 6 1 P 9/14	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 13/12		
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 15/00		
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/02		
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/00		
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/04		
A 6 1 P 19/04	A 6 1 P 19/06		
A 6 1 P 19/06	A 6 1 P 19/10		
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 21/00		
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 21/04		
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/02		
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 25/02	1 0 3	
A 6 1 P 25/04	A 6 1 P 25/04		
A 6 1 P 25/08	A 6 1 P 25/08		
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/14		
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/16		
A 6 1 P 25/18	A 6 1 P 25/18		
A 6 1 P 25/20	A 6 1 P 25/20		
A 6 1 P 25/22	A 6 1 P 25/22		
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02		
A 6 1 P 27/06	A 6 1 P 27/06		
A 6 1 P 27/12	A 6 1 P 27/12		
A 6 1 P 27/16	A 6 1 P 27/16		
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 31/10	A 6 1 P 31/10		
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18		

A 6 1 P	31/22	A 6 1 P	31/22	
A 6 1 P	33/00	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	35/00	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/00	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	37/02	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	37/04	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	37/08	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 0 7 K	16/40	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 1 2 N	1/15	C 0 7 K	16/40	
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	9/16	C 1 2 N	9/16	B
C 1 2 N	15/02	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 P	21/08	C 1 2 Q	1/42	
C 1 2 Q	1/42	C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/15	G 0 1 N	33/50	Z
G 0 1 N	33/50	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N	33/566	
		C 1 2 N	5/00	A
		C 1 2 N	15/00	C
		A 6 1 K	37/54	

- (31)優先権主張番号 60/216,529
(32)優先日 平成12年7月6日(2000.7.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/218,080
(32)優先日 平成12年7月12日(2000.7.12)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/220,117
(32)優先日 平成12年7月21日(2000.7.21)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

- (72)発明者 ボーゲン、マライア・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州94577・サンレアンドロ・サンティアゴロード 14244
(72)発明者 ディング、リー
アメリカ合衆国カリフォルニア州94306・パロアルト・#146・アルマストリート 3353
(72)発明者 エリオット、ビッキー・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州95121・サンノゼ・ポルトンブレイスウェイ 3770

- (72)発明者 ガンディー、アミーナ・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 5・メンロパーク・# 1・ローブルアベニュー 8 3 7
- (72)発明者 グリフィン、ジェニファー・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メローウェイ 3 3 6 9 1
- (72)発明者 ハファリア、エープリル
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 0 5 4・サンタクララ・コーレデプリマペーラ 2 2 2 7
- (72)発明者 キーニー、ライアム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 2 7・サンフランシスコ・ウッドサイドアベニュー 5 0
- (72)発明者 リー、アーンステーン・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 7 0 6・アルバニー・ケインズストリート 6 2 4
- (72)発明者 リュ、ヤン
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 3 0 3・パロアルト・コリーナウェイ 3 8 8 5
- (72)発明者 ニュエン、ダニエル・ピー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・リッジウッドドライブ 1 4 0 3
- (72)発明者 アービズ、チャンドラ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 5・サンノゼ・モロッコドライブ 1 7 0 6
- (72)発明者 ランクマール、ジャヤラクシミ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 5 5・フレモント・メイバードサークル 3 4 3 5 9
- (72)発明者 レディ、ルーパ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 6・サニーバイル・# 3・ウェストマッキンレーアベニュー 1 2 3 3
- (72)発明者 サンジャンワラ、マデュー・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 2 4・ロスアルトス・シルビアコート 2 1 0
- (72)発明者 スチュワート、エリザベス・エイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 4 0 2・サンマテオ・モンティセロロード 1 7 6 7
- (72)発明者 タング、ワイ・トム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 1 8・サンノゼ・ランウィックコート 4 2 3 0
- (72)発明者 ソートン、マイケル
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 6 2・ウッドサイド・メッドウェイロード 9
- (72)発明者 トリボレー、キャサリン・エム
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 1 0 7・サンフランシスコ・# 5・テネシーストリート 1 1 2 1
- (72)発明者 チョーラ、ナリンダー・ケイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 5 8 7・ユニオンシティ・# 7 1 2・ユニオンスクエア 3 3
- (72)発明者 ヤング、ジュンミング
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 5 1 2 9・サンノゼ・パークレーン 7 1 2 5
- (72)発明者 ヤオ、モニック・ジー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 4 3・マウンテンビュー・フレデリックコート 1 1 1
- (72)発明者 ユエ、ヘンリー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 4 0 8 7・サニーバイル・ルイスアベニュー 8 2 6

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 BB29 BB48 BB50 BB51 CB01 DA13 DA36
FB02 FB03 FB06 FB12 GC15
4B024 AA01 AA12 AA15 BA11 CA04 DA02 DA06 EA02 EA04 GA03
GA11 HA01 HA14
4B050 CC03 DD11 LL01 LL03
4B063 QA18 QQ33 QQ42 QR32 QR55 QS34
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA99Y AB01 AB04 BA02 BA08 CA25 CA31
4C084 AA01 AA07 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 CA18 DC22 DC50

NA14 ZA011 ZA021 ZA051 ZA061 ZA081 ZA121 ZA161 ZA201 ZA221
ZA241 ZA331 ZA341 ZA361 ZA451 ZA511 ZA531 ZA541 ZA551 ZA591
ZA661 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZA971 ZB051 ZB071 ZB081
ZB091 ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZB271 ZB331 ZB351 ZB381 ZB391
ZC061 ZC311 ZC351 ZC412 ZC551
4H045 AA11 CA40 DA75 DA76 EA28 EA50 FA74

专利名称(译)	蛋白磷酸酶		
公开(公告)号	JP2004513620A	公开(公告)日	2004-05-13
申请号	JP2002510665	申请日	2001-06-14
[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	オウヤングジャニス ボーグンマライアアール デイングリー エリオットビッキーエス ガンディーアミーナアール グリフィンジェニファーエイ ハファリアエープリル キーニーライアム リーアーンステイーンエイ リュヤン ニュエンダニエルビー アービズチャンドラ ランクマールジャヤラクシミ レディルーパ サンジャンワラマデューエス スチュワートエリザベスエイ タングワイトム ソーントンマイケル トリボレーキャサリーンエム チョーラナリンダーケイ ヤングジュンミング ヤオモニークジー ユエヘンリー		
发明人	オウ-ヤング、ジャニス ボーグン、マライア・アール デイング、リー エリオット、ビッキー・エス ガンディー、アミーナ・アール グリフィン、ジェニファー・エイ ハファリア、エープリル キーニー、ライアム リー、アーンステイーン・エイ リュ、ヤン ニュエン、ダニエル・ビー アービズ、チャンドラ ランクマール、ジャヤラクシミ レディ、ルーパ サンジャンワラ、マデュー・エス スチュワート、エリザベス・エイ タング、ワイトム ソーントン、マイケル トリボレー、キャサリーン・エム チョーラ、ナリンダー・ケイ ヤング、ジュンミング		

ヤオ、モニーク・ジー
ユエ、ヘンリー

IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K38/46 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/06 A61P5/14 A61P5/24 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/16 C12N9/18 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/55 C12P21/08 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00 C12N9/18
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/10 A61P5/06 A61P5/14 A61P5/24 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/10 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/10.101 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P25/02.103 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/20 A61P25/22 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/06 A61P27/12 A61P27/16 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/16.B C12P21/08 C12Q1/42 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.C A61K37/54
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB14 2G045/BB29 2G045/BB48 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA15 4B024/BA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ33 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA31 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/DC22 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA051 4C084/ZA061 4C084/ZA081 4C084/ZA121 4C084/ZA161 4C084/ZA201 4C084/ZA221 4C084/ZA241 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA661 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB091 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZB381 4C084/ZB391 4C084/ZC061 4C084/ZC311 4C084/ZC351 4C084/ZC412 4C084/ZC551 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74
优先权	60/212447 2000-06-16 US 60/213746 2000-06-22 US 60/215210 2000-06-29 US 60/216529 2000-07-06 US 60/218080 2000-07-12 US 60/220117 2000-07-21 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了鉴定和编码PP的人蛋白质磷酸酶 (PP) 和多核苷酸。 本发明还提供表达载体， 宿主细胞， 抗体， 激动剂和拮抗剂。 本发明还提供了用于诊断， 治疗或预防与PP异常表达有关的疾病的方法。

Invoice / 送り状 ID	送り状 NO:	Invoice 送り状 ID	Invoice 送り状 NO	Invoice
8224526	1	8224526001	10	8224526001
7473604	2	7473604001	11	7473604001
1437500	3	1437500001	12	1437500001
7476661	4	7476661001	13	7476661001
5320695	5	5320695001	14	5320695001
8116710	6	8116710001	15	8116710001
5370008	7	5370008001	16	5370008001
3016391	8	3016391001	17	3016391001
7476660	9	7476660001	18	7476660001