

(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2004-532619

(P2004-532619A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

| | | |
|----------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 N 15/00 | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 2 G O 4 5 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 P 1/04 | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 P 1/04 | A 6 1 P 9/10 | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 P 9/10 | A 6 1 P 11/00 | 4 B O 6 4 |
| A 6 1 P 11/00 | A 6 1 P 11/06 | 4 B O 6 5 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 244 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-566207 (P2002-566207)
 (86) (22) 出願日 平成14年2月15日 (2002. 2. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年8月18日 (2003. 8. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/005162
 (87) 国際公開番号 W02002/066494
 (87) 国際公開日 平成14年8月29日 (2002. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 60/269, 366
 (32) 優先日 平成13年2月16日 (2001. 2. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/294, 181
 (32) 優先日 平成13年5月29日 (2001. 5. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 391015708
 ブリストル-マイヤーズ スクイブ カン
 パニー
 BRISTOL-MYERS SQUIB
 B COMPANY
 アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101
 54 ニューヨーク パーク アベニュー
 345
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100076521
 弁理士 坪井 有四郎
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞内シグナル伝達カスケードに関与する新規なヒト遺伝子RET16の同定およびクローニング

(57) 【要約】

本発明は、TNF-アルファ刺激したヒト微細血管内皮細胞からクローニング、単離および同定した、細胞シグナル伝達カスケードに関与するタンパク質 (RET16 と称する) をコードする新たに見出されたポリヌクレオチド、並びにマウスおよびラットのRET16 オートログを記載する。本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドに関連する、RET16 ポリペプチド配列、発現ベクター、宿主細胞、アゴニスト、アンタゴニスト、アンチセンス分子、および抗体をも記載する。ヒトRET16 タンパク質のモジュレーター、とりわけインヒビターをスクリーニングする方法、および治療剤および診断剤のためのRET16 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの使用を記載する。

```

1  gctgttccc  tctgtctgg  gtctccgccc  gggccggccc  gggcagctc
51  acctgcccgg  caactgacc  gcaaccggcc  tgggcaactt  gaagggggat
101  cccggcggcc  cccgctctg  caggctgttt  ttcttcaaat  aaagaacatg
151  gtgaaacctg  ttcaacaatt  agctgatcat  ggccgagatg  tcaactgctg
201  tgcctctctc  tttccctct  tggctacttg  ctctctggcc  aaaaacttc
251  gctgtacttc  gttaccggac  ttactgaaac  tggccacatt  tcaattgtag
301  ttctataact  atgctgcca  ctgctctgt  ttctccctt  caggacat
351  ttggcctg  tttcaacag  atggtaccac  tggcctatgg  aactatgaaa
401  arggacagat  gctggcagtg  atggaaacag  ctaggggcag  cctctgagg
451  gtttgccagt  ttcccccaga  ctccacgtgt  ttggcatcag  gggcagctga
501  tggcaactgt  gttttgtgga  atgacacgtc  atacaattta  tataagctg
551  gtagtcttaa  agatggctcc  ttggggcagat  gctgcatctt  tcaattgga
601  agctctcttg  tcaactggct  ctcactgtgt  gatttaacag  tgtgggatga
651  taaaatgagg  tgcctgcata  gtgaaaagac  acatgatctt  ggaattacct
701  gctggcattt  ttcttcaacg  caagtctctg  atggagaaca  aggtctcag
751  tttttctgac  tggcctcag  tggctcagat  tggcaagctc  aaatttgat
801  tgtttctctt  acccatatct  taggttttga  attaaaatt  aaaaatcac
851  tgaagtggga  ctgtctctct  gttctggctt  gctcttttt  ccaatgatgg
901  cagatgctag  tctcagggtc  agtgatgaag  tctgtctatg  tataatgata
951  taatactgag  aatatacttc  accatctgac  tccagccacc  aggtatgta
1001  caactgtctg  ttttgccctc  aatacccttt  tacttgccac  tggttccatg
1051  gacaaaacag  tgaacatctg  gcaatttgac  ctggaaacac  tttggcaggc
1101  aaggcgcaca  gaacatcagc  tgaagcaatt  tactgaagat  tggtagagg
1151  aggatgtctc  acaatggctt  tgtgcacaag  attcaaaaga  tcttctggtt
1201  atttcaaga  tgaataacat  tcatggaaaa  gaactgttga  atcttataaa
1251  agaaagctcg  gctgatgatt  tcaaaatgaa  gagctcaggc  atctctttct
1301  aagtgctggg  gaanaatgaa  gagctcaggc  ccaaggttaa  atccctttct
1351  tcaggaatcc  ctgatgaatt  tacaatgcca  ataactagag  aacttatgaa
1401  agatccggcc  atcgtctcag  atggctatct  atatgaaag  gaagcaatgg
1451  aaaaatggat  cagcaaaaag  aaactgacaa  ctccctatgc  aaaaatggtt
1501  ctctctcag  cgttaactac  ccaaatag  actctgaaaa  tggcctcaca
1551  tggatggcgg  gagcaaacac  aaaaatgaaa  ttgttgatct  tttattatct
1601  atattttcag  tgalctcatt  tgaatgattt  ataggtaaat  actlaactga
1651  cattatbaa  agcaaaaacg  gaaaaggtta  aactctttaa  atttagttac
1701  ctataaaaat  tgtcaatttt  cttcttttaa  aaaaacactg  gacttactat
1751  aaaaagcctt  tgttactagt  gaanaaatc  ttacgtata  tgaanaata
1801  gttactctt  aaaaaaaa
    
```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- 以下よりなる群から選ばれるポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド：
- (a) 細胞内シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、またはその機能性の断片であって、該ポリペプチドが配列番号 2、配列番号 4 および配列番号 7 よりなる群から選ばれたアミノ酸配列を含むもの；
- (b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 8 よりなる群から選ばれた配列を含む単離ポリヌクレオチド；
- (c) 細胞シグナル伝達カスケードに關与するシグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号 2 または配列番号 4 の配列と少なくとも 80% の配列同一性を有するもの；
- (d) (i) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 8 よりなる群から選ばれた配列；(ii) 遺伝子コードの縮重の結果として、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 8 よりなる群から選ばれた配列からの核酸配列縮重物；または (iii) これらに相補的な核酸配列、を有する核酸配列を含む単離ポリヌクレオチド；
- (e) ヒト R E T 1 6 ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (f) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 1 ~ 1 5 7 5 を含み、配列番号 2 マイナス開始コドンのアミノ酸 2 ~ 4 7 6 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (g) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 4 8 ~ 1 5 7 5 を含み、開始コドンを含む配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 4 7 6 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (h) 配列番号 1 2 と少なくとも 8 2 . 0 % 同一のヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド；
- (i) ヒト R E T 1 6 . 2 ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (j) 配列番号 1 2 のヌクレオチド 1 1 4 ~ 1 2 6 2 を含み、配列番号 1 3 マイナス開始コドンのアミノ酸 2 ~ 3 8 4 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (k) 配列番号 1 2 のヌクレオチド 1 1 1 ~ 1 2 6 2 を含み、開始コドンを含む配列番号 1 3 のアミノ酸 1 ~ 3 8 4 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (l) ヒト R E T 1 6 . 3 ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (m) 配列番号 1 4 のヌクレオチド 1 3 9 ~ 1 6 4 1 を含み、配列番号 1 5 マイナス開始コドンのアミノ酸 2 ~ 5 0 2 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (n) 配列番号 1 4 のヌクレオチド 1 3 6 ~ 1 6 4 1 を含み、開始コドンを含む配列番号 1 5 のアミノ酸 1 ~ 5 0 2 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (o) マウス R E T 1 6 ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (p) 配列番号 6 のヌクレオチド 2 2 ~ 1 4 4 3 を含み、配列番号 4 マイナス開始コドンのアミノ酸 2 ~ 4 7 5 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (q) 配列番号 6 のヌクレオチド 1 9 ~ 1 4 4 3 を含み、開始コドンを含む配列番号 7 のアミノ酸 1 ~ 4 7 5 に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；
- (r) A T C C 受託番号 P T A - 3 1 6 1 の核酸配列を有する、(a) から (q) のいずれかに記載のポリヌクレオチド；
- (s) (a) から (r) のいずれかに記載のポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチド；
- (t) 相補的な核酸配列が、(a) から (r) のいずれかから選ばれる核酸配列を含む変性した二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖に中くらいまたは高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする、単離ポリヌクレオチド；
- (u) 中くらいのストリンジェンシーの条件が、 $0.2 \times S S P E$ または $S S C$ および $0.2\% S D S$ 中、約 4 2 ~ 約 5 0 の温度で洗浄することを含む、(t) に記載の単離ポ

リヌクレオチド；

(v) 高いストリンジェンシーの条件が、0.018M NaCl中、約65 で安定なハイブリッドを生成する核酸配列のハイブリダイゼーションを可能にするものである、(t)に記載の単離ポリヌクレオチド；

(w) 細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号13の配列と少なくとも82%の配列同一性を有するもの；

(x) 細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号15の配列と少なくとも95%の配列同一性を有するもの；

(y) 番号12の配列と少なくとも68.2%の配列同一性を有する、単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片；および

(z) 番号14の配列と少なくとも93.1%の配列同一性を有する、単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片。

10

【請求項2】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む組成物。

【請求項3】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項4】

請求項3に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項5】

以下よりなる群から選ばれるポリペプチド配列を含む実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

(a) 配列番号2または配列番号4に示す配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

；

(b) 配列番号2または配列番号4に示す配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

30

(c) 配列番号2または配列番号4に示す配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

(d) 細胞シグナル伝達カスケードに關与し、ATCC受託番号PTA-3161の核酸配列によりコードされる、単離および実質的に精製したヒト細胞シグナル伝達タンパク質；

(e) 配列番号7または配列番号9に示す配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

(f) 配列番号7または配列番号9に示す配列と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

40

(g) 細胞シグナル伝達カスケードに關与し、配列番号1または配列番号3に記載の核酸配列、または遺伝子コードの縮重の結果として配列番号1または配列番号3からの核酸配列縮重物を有するポリヌクレオチドによりコードされる、実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

(h) 配列番号7または配列番号9に示すアミノ酸配列を有する、実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；

(i) 配列番号2のアミノ酸2~476を含む単離ポリペプチドであって、該アミノ酸2~476が配列番号2マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；

50

- (j) 配列番号 13 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされる RET 16 変異体タンパク質；
- (k) ATCC 受託番号 PTA - 3161 の核酸配列によってコードされる単離 RET 16.2 変異体タンパク質；
- (l) 配列番号 12 のポリヌクレオチド配列によってコードされる RET 16 変異体タンパク質；
- (m) 配列番号 13 のアミノ酸 2 ~ 384 を含む単離ポリペプチドであって、該アミノ酸 2 ~ 384 が配列番号 13 マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (n) 配列番号 15 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされる RET 16 変異体タンパク質；
- (o) ATCC 受託番号 PTA - 3161 の核酸配列によってコードされる単離 RET 16.3 変異体タンパク質；
- (p) 配列番号 14 のポリヌクレオチド配列によってコードされる RET 16 変異体タンパク質；
- (q) 配列番号 15 のアミノ酸 2 ~ 502 を含む単離ポリペプチドであって、該アミノ酸 2 ~ 502 が配列番号 15 マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (r) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされる RET 16 タンパク質；
- (s) 配列番号 6 のポリヌクレオチド配列によってコードされる RET 16 タンパク質；
- (t) 配列番号 7 のアミノ酸 2 ~ 475 を含む単離ポリペプチドであって、該アミノ酸 2 ~ 475 が配列番号 7 マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (u) 配列番号 13 に示す配列と少なくとも 82% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する實質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；および
- (v) 配列番号 15 に示す配列と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、細胞シグナル伝達カスケードに關与する實質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のタンパク質またはポリペプチド、またはその抗原性エピトープに特異的に結合する、精製した抗体。

【請求項 7】

細胞シグナル伝達カスケードに關与するタンパク質の製造方法であって、工程：

- (a) 請求項 4 に記載の宿主細胞をポリペプチドの発現に適した条件下で培養し、ついで
- (b) 該ポリペプチドを宿主細胞培養液から回収することを含む方法。

【請求項 8】

生物学的試料中の細胞シグナル伝達カスケードタンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはその断片を検出する方法であって、工程：

- (a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを生物学的試料の核酸材料とハイブリダイズさせ、それによってハイブリダイゼーション複合体を生成させ、ついで
- (b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出し、その際、該複合体の検出はユビキチン結合酵素をコードするポリヌクレオチド、またはその断片の該生物学的試料中の存在と相関関係を有することを含む方法。

【請求項 9】

分子または化合物のライブラリーを細胞シグナル伝達カスケードに關与するタンパク質をコードするポリヌクレオチドでスクリーニングして、該ライブラリー中に該ポリヌクレオチド配列に特異的に結合する少なくとも 1 の分子または化合物を同定する方法であって、

(a) 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを被験分子または化合物のライブラリーと特異的な結合が可能な条件下で混合し、ついで

10

20

30

40

50

(b) 特異的な結合を検出し、それによって該ポリヌクレオチド配列に特異的に結合する被験分子または化合物を同定することを含む方法。

【請求項10】

細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達タンパク質の活性を変調することのできる候補化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被験化合物を請求項5に記載のタンパク質を発現する細胞または組織と接触させ、

(b) 候補変調化合物として、細胞シグナル伝達カスケードに關与するタンパク質の活性を変調する被験化合物を選択する

ことを含む方法。

10

【請求項11】

請求項5に記載のタンパク質を炎症関連疾患または障害を治療するのに有効な量にて投与することを含む、炎症関連疾患または障害の治療方法。

【請求項12】

該疾患または障害が、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節炎、乾癬、喘息、虚血 - 再灌流、多発性硬化症、臓器または組織移植の拒絶、慢性閉塞性肺疾患、炎症性胃腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、亜急性呼吸障害症候群、全身性エリテマトーデス、嚢胞性線維症、自己免疫疾患、癌、腫瘍および新生物よりなる群から選ばれる、請求項11に記載の方法。

20

【請求項13】

ヒト細胞シグナル伝達タンパク質が第二の細胞シグナル伝達タンパク質に結合するのを抑制または妨害する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被験化合物の存在下または不在下、請求項5に記載の細胞シグナル伝達タンパク質を該タンパク質が結合または会合する第二の細胞シグナル伝達分子と結合が可能な条件下で接触させ、

(b) 該被験化合物の存在下での結合レベルを該被験化合物の不在下での結合レベルと比較することによって、該細胞シグナル伝達タンパク質と該第二の細胞シグナル伝達分子との結合レベルが低減または抑制されたか否かを決定する

ことを含む方法。

30

【請求項14】

プロテインキナーゼによる細胞シグナル伝達カスケードタンパク質のリン酸化を抑制する化合物の同定方法であって、

(a) 請求項5に記載の細胞シグナル伝達カスケードタンパク質を、 ^{32}P -ガンマ-ATPを含む反応緩衝液中、該細胞シグナル伝達タンパク質の固相基体への結合を可能とする条件下で該基体に結合させ、

(b) 被験化合物の存在下または不在下でプロテインキナーゼを加え、

(c) 該被験化合物の不在下で観察されるリン酸化レベルと比較して、該被験化合物の存在が該細胞シグナル伝達カスケードタンパク質に取り込まれる ^{32}P 標識の量の低減という結果となるか否かを決定し、それによって細胞シグナル伝達カスケードタンパク質のリン酸化を抑制する被験化合物を同定する

40

ことを含む方法。

【請求項15】

以下よりなる群から選ばれるポリヌクレオチド配列からなる単離ポリヌクレオチド：

(a) ヒトRET16ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(b) 配列番号1のヌクレオチド151～1575からなり、配列番号2マイナス開始コドンのアミノ酸2～476に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1のヌクレオチド148～1575からなり、開始コドンを含む配列番号2のアミノ酸1～476に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(d) ヒトRET16.2ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

50

(e) 配列番号12のヌクレオチド114~1262からなり、配列番号13マイナス開始コドンのアミノ酸2~384に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(f) 配列番号12のヌクレオチド111~1262からなり、開始コドンを含む配列番号13のアミノ酸1~384に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(g) 配列番号12と少なくとも68.2%同一のヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド；

(h) ヒトRET16.3ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(i) 配列番号14のヌクレオチド139~1641からなり、配列番号15マイナス開始コドンのアミノ酸2~502に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(j) 配列番号14のヌクレオチド136~1641からなり、開始コドンを含む配列番号15のアミノ酸1~502に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(k) 配列番号14と少なくとも93.1%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドからなる単離ポリヌクレオチド；

(l) マウスRET16ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(m) 配列番号6のヌクレオチド22~1443からなり、配列番号4マイナス開始コドンのアミノ酸2~475に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(n) 配列番号6のヌクレオチド19~1443からなり、開始コドンを含む配列番号7のアミノ酸1~475に対応するポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド；

(o) (a)から(n)のいずれかに記載のポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチド；

(p) 相補的な核酸配列が、(a)から(o)のいずれかから選ばれる核酸配列を含む変性した二本鎖ポリヌクレオチドのいずれかの鎖に中くらいまたは高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする、単離ポリヌクレオチド；

(q) 中くらいのストリンジェンシーの条件が、 $0.2 \times S S P E$ または $S S C$ および $0.2\% S D S$ 中、約42~約50の温度で洗浄することを含む、(p)に記載の単離ポリヌクレオチド；

(r) 高いストリンジェンシーの条件が、 $0.018 M NaCl$ 中、約65で安定なハイブリッドを生成する核酸配列のハイブリダイゼーションを可能にするものである。(p)に記載の単離ポリヌクレオチド；

(s) 細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号13の配列と少なくとも82%の配列同一性を有するもの；

(t) 細胞シグナル伝達カスケードに關与する細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号15の配列と少なくとも95%の配列同一性を有するもの；

(u) 番号12の配列と少なくとも68.2%の配列同一性を有する、単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片；および

(v) 番号14の配列と少なくとも93.1%の配列同一性を有する、単離および精製したポリヌクレオチド、またはその断片。

【請求項16】

請求項15に記載の単離核酸分子を含む組換えベクター。

【請求項17】

請求項16に記載の組換えベクターを含む組換え宿主細胞。

【請求項18】

以下よりなる群から選ばれるポリペプチド配列からなる実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質：

10

20

30

40

50

- (a) 配列番号2のアミノ酸2～476からなる単離ポリペプチドであって、該アミノ酸2～476が配列番号2マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (b) 配列番号13のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされるRET16変異体タンパク質；
- (c) ATCC受託番号PTA-3161の核酸配列によってコードされる単離RET16.2変異体タンパク質；
- (d) 配列番号12のポリヌクレオチド配列によってコードされるRET16変異体タンパク質；
- (e) 配列番号13のアミノ酸2～384からなる単離ポリペプチドであって、該アミノ酸2～384が配列番号13マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (f) 配列番号15のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされるRET16変異体タンパク質；
- (g) ATCC受託番号PTA-3161の核酸配列によってコードされる単離RET16.3変異体タンパク質；
- (h) 配列番号14のポリヌクレオチド配列によってコードされるRET16変異体タンパク質；
- (i) 配列番号15のアミノ酸2～502からなる単離ポリペプチドであって、該アミノ酸2～502が配列番号15マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (j) 配列番号7のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする核酸配列によってコードされるRET16タンパク質；
- (k) 配列番号6のポリヌクレオチド配列によってコードされるRET16タンパク質；
- (l) 配列番号7のアミノ酸2～475からなる単離ポリペプチドであって、該アミノ酸2～475が配列番号7マイナス開始メチオニンのポリペプチドを含むもの；
- (m) 配列番号13に示す配列と少なくとも82%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、細胞シグナル伝達カスケードに關与する實質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；および
- (n) 配列番号15に示す配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる、細胞シグナル伝達カスケードに關与する實質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質。

10

20

30

【請求項19】

該疾患または障害が、TNF-経路の異所性の活性化と關連する障害、異所性の細胞移動と關連する障害、異所性の細胞増殖と關連する障害、異所性の細胞転移と關連する障害、喘息、若年性特発性関節炎、腫瘍細胞の造血性転移、高インスリン血症、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化症、心血管性疾患、腫瘍の進行、転移、直腸癌、ヴェーゲナー肉芽腫症、幹細胞移植合併症、サラセミア、アテローム性動脈硬化症、自己免疫疾患、アテローム性動脈硬化症、虚血-再灌流障害、急性肺障害、慢性関節リウマチ、移植拒絶、全身性エリテマトーデス、冠状動脈石灰化、虚血性心、およびアレルギー性炎症よりなる群から選ばれる、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

配列番号1、配列番号12、または配列番号14から選ばれるRET16ポリヌクレオチドに相補的なアンチセンスRET16オリゴヌクレオチド。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規な完全長ヒトRET16遺伝子およびそのコードされたポリペプチド生成物(TNF刺激されたヒト肺微細血管内皮細胞で発現される)の同定およびクロニングに関する。本発明はさらに、RET16のオーソログ(orthologs)、およびRET16ポリヌクレオチド配列およびそのコードされた生成物の細胞内シグナル伝達カスケードにおける細胞シグナル伝達分子としての推定の役割に関する。本発明はまた、炎症および炎症性疾患、状態、または障害が關与する、および/または制御できない細胞の増殖、たと

50

えば癌、腫瘍、新生物などが関与する治療剤および方法における R E T 1 6 ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびそのモジュレーターの使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

炎症性疾患の発生は、循環血球、たとえば白血球が内皮を通過して組織中に浸潤することを特徴とする。この「ゲートウェイ (gateway)」機能を媒体する多くの重要な事象が内皮細胞で起こる。内皮細胞はレセプターやケモカインを発現し、これらレセプターやケモカインは白血球を順につなぎ、活性化させ、強固に付着させ、内皮細胞接合間に遊出させる。このプロセスは腫瘍壊死因子 (T N F) などの初期炎症メディエーターの産生によって開始される。

10

【0003】

この一連のレセプターおよびケモカインの発現の協同 (coordinated) 刺激は、転写因子、キナーゼおよびスカフォードタンパク質を含む細胞内シグナル伝達分子によって媒体される。これらシグナル伝達分子はシグナル伝達カスケードを形成し、該カスケードは炎症プロセスの発生の「マスタースイッチ」である。 N F - B などのこのカスケードの成員は知られている。 T N F 活性化内皮で差別的に発現される遺伝子の分析は、上記「マスタースイッチ」カスケードの成員の同定の手助けとなりうる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、 T N F - アルファ活性化ヒト内皮細胞で発現される R E T 1 6 遺伝子を提供するものであり、該遺伝子のコードされた産物は細胞シグナル伝達カスケードに関与する細胞シグナル伝達分子として機能すると考えられる。細胞シグナル伝達カスケードにおいて役割を果たす分子は、炎症因子、たとえばサイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、ロイコトリエンなどへの細胞応答に関与している。さらに、 R E T 1 6 は細胞シグナル伝達カスケードに関与する細胞シグナル伝達タンパク質の候補として、様々な細胞増殖関連疾患または障害に関与していると考えられる。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、 R E T 1 6 と称する新たに発見されたヒト遺伝子およびそのコードされた産物を提供するものであり、該 R E T 1 6 は T N F - アルファで刺激されたヒト微細血管内皮細胞で発現されることがわかった。本発明によれば、 R E T 1 6 は細胞シグナル伝達タンパク質としての機能を有する細胞質タンパク質である。

30

【0006】

本発明の一つの側面は、配列番号 1 に示す R E T 1 6 ポリヌクレオチド配列を提供する。本発明はまた、配列番号 1 の相補鎖、または配列番号 1 の変異体を含むポリヌクレオチド配列をも提供する。さらに、本発明は、中くらいまたは高いストリンジエンシーの条件下で配列番号 1 のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列にも関する。

【0007】

本発明の他の側面は、配列番号 1 のポリヌクレオチドによってコードされ配列番号 2 のアミノ酸配列を有する R E T 1 6 ポリペプチド、または機能性のまたは生物学的に活性なその部分を提供する。本発明に従い、単離され実質的に純粋な R E T 1 6 タンパク質が提供される。

40

【0008】

本発明のさらなる側面は、ヒト R E T 1 6 オープンリーディングフレーム c D N A の単離したポリヌクレオチド配列 (1 5 3 2 b p ; 配列番号 3) および該オープンリーディングフレームヒト R E T 1 6 によってコードされ配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド、または機能性のまたは生物学的に活性なその部分を提供する。単離した実質的に純粋な R E T 1 6 タンパク質またはポリペプチド、たとえば配列番号 4 が提供される。

50

また、本発明に従い、ベクター中にクローニングした1532bpのヒトRET16 (RET16.1とも称する) オープンリーディングフレームポリヌクレオチド配列を、ブダペスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC; 10801ユニバーシティー・プール、マナサス、バージニア20110-2209) にATCC受託番号PTA-3161にて2001年3月7日に寄託してある。クローニングしたRET16変異体cDNA、すなわちRET16.2およびRET16.3を含むベクターもまた、ブダペスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC; 10801ユニバーシティー・プール、マナサス、バージニア20110-2209) にATCC受託番号PTA-3161にて2001年3月7日に寄託してある。従って、本発明はATCC受託番号PTA-3161を含むRET16 cDNA核酸配列を提供する。 10

【0009】

本発明のさらなる側面は、配列番号3の相補鎖、またはその変異体を含むポリヌクレオチド配列を提供する。さらに、本発明は、中くらいまたは高いストリンジェンシーの条件下で配列番号3のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列にも関する。さらに、ヒトRET16の630bpの部分核酸配列 (配列番号5) が提供される。

【0010】

本発明の他の側面は、RET16の変異体を提供する。本発明に従い、単離したRET16.2変異体ポリヌクレオチド (配列番号12) およびコードされたそのアミノ酸配列 (配列番号13) が提供される。さらに、単離したRET16.3変異体ポリヌクレオチド (配列番号14) およびコードされたそのアミノ酸配列 (配列番号15) が提供される。これら配列の部分または断片、好ましくは機能性のまたは生物学的に活性な部分または断片も提供される。 20

【0011】

本発明のさらなる特色は、ヒトRET16タンパク質のマウスおよびラットオーソログを提供する。本発明に従い、配列番号6はマウスRET16オーソログのポリヌクレオチド配列を示す。配列番号7は、配列番号6によってコードされるマウスRET16ポリペプチドオーソログのアミノ酸配列を示す。配列番号8はラットRET16オーソログの部分ポリヌクレオチド配列を示し、配列番号9は配列番号8によってコードされるラットRET16オーソログの部分ポリペプチド配列のアミノ酸配列を示す。 30

【0012】

本発明の他の特色は、好ましくはヒトRET16のRET16ポリヌクレオチド配列、またはその断片、またはコードされたRET16ポリペプチド、またはその断片または部分を含む組成物を提供する。また、少なくとも1のRET16ポリペプチド、または機能的なその部分を含む医薬組成物であって、薬理的に許容しうるビヒクル、たとえば担体、賦形剤、または希釈剤をも含む医薬組成物も本発明により提供される。

【0013】

本発明のさらなる側面は、コードされたRET16ポリペプチドのN末端、C末端または内部での欠失ポリペプチドおよびこれら欠失ポリペプチドを含む組成物を提供する。これら欠失ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供される。欠失ポリペプチドの免疫原および/または抗原性エピトープとしての使用は本明細書においてさらに記載する。 40

【0014】

本発明のさらなる側面は、RET16.1、RET16.2、RET16.3およびマウスRET16の結果として得られるコードされたポリペプチドに加えて、RET16.1、RET16.2、RET16.3および最初の開始コドンに欠くRET16マウスオーソログのポリヌクレオチド配列を提供する。さらに詳細には、配列番号1のヌクレオチド151~1575に対応するポリヌクレオチド、および配列番号2のアミノ酸2~476に対応するポリペプチドが提供される; 配列番号12のヌクレオチド114~1262に対応 50

するポリヌクレオチド、および配列番号13のアミノ酸2~384に対応するポリペプチドが提供される；配列番号14のヌクレオチド139~1641に対応するポリヌクレオチド、および配列番号15のアミノ酸2~502に対応するポリペプチドが提供される；および配列番号6のヌクレオチド19~1443に対応するポリヌクレオチド、および配列番号7のアミノ酸2~475に対応するポリペプチドが提供される。RET16.1、RET16.2、RET16.3およびマウスRET16コード配列を含む組換えベクター、およびここで記載のベクターを含む宿主細胞もまた提供される。

【0015】

本発明の他の側面は、RET16核酸配列のアンチセンス、好ましくはヒトRET16核酸配列に対するアンチセンス、並びにRET16核酸分子またはアンチセンス分子のオリゴヌクレオチド、断片、または部分を提供する。ヒトRET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその部分または断片を含む発現ベクターおよび宿主細胞もまた提供される。

10

【0016】

本発明のさらに他の側面は、配列番号2または配列番号4に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはその断片の製造方法であって、工程(a)本発明によるヒトRET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも機能的な断片を含む発現ベクターを含む宿主細胞を、該ポリヌクレオチドの発現に適した条件下で培養し、ついで(b)該ポリペプチドを宿主細胞から回収することを含む方法を提供する。

【0017】

本発明のさらなる特色は、治療剤および診断剤として使用するための、RET16ポリペプチドまたはそのエピトープに特異的に結合する抗体およびその結合フラグメントを提供する。

20

【0018】

本発明のさらに他の特色は、RET16ポリペプチド、好ましくはヒトRET16ポリペプチドに結合および/または変調する因子または分子、たとえばインヒビター、他の細胞内シグナル伝達分子およびアンタゴニストのスクリーニング方法、並びにモデュレーター、とりわけインヒビターおよびアンタゴニスト、とりわけ本明細書に記載のスクリーニング法によって得られるものを提供する。また、RET16と1またはそれ以上の他の細胞シグナル伝達タンパク質との相互作用、たとえば結合相互作用のインヒビターまたはアクチベーターのスクリーニング方法も提供される。

30

【0019】

本発明の他の側面は、本発明のRET16ポリペプチド、たとえば配列番号2、配列番号4、配列番号13、または配列番号15の実質的に精製したアンタゴニストまたはインヒビターを提供する。この点に関し、制限されない一例として、本発明のRET16ポリペプチドのアミノ酸配列、たとえば配列番号2、配列番号4、配列番号13、または配列番号15の全てまたは免疫原性および/または抗原性の部分を含むポリペプチドに結合する精製した抗体が提供される。

【0020】

本発明のさらに他の側面は、本発明のRET16ポリペプチド、たとえば配列番号2、配列番号4、配列番号13、または配列番号15の実質的に精製したアゴニストまたはアクチベーターを提供する。

40

【0021】

本発明の他の側面は、本明細書に記載の細胞シグナル伝達カスケードに関与するRET16ポリヌクレオチドおよびそのコードされたポリペプチドの発現に関連する障害または疾患の診断および/またはスクリーニングに使用するための、RET16核酸配列、ポリペプチド、ペプチドおよび抗体を提供する(たとえば図9を参照)。

【0022】

本発明の他の側面は、RET16関連疾患の検出および/またはRET16関連疾患または障害の治療または処置への患者の応答のモニターのためのRET16プローブまたはプ

50

ライマーを提供する。プローブまたはプライマーの配列は、本明細書に記載の R E T 1 6 の核酸配列またはアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の特色は、本明細書に記載の R E T 1 6 ポリヌクレオチドおよびそのコードされたポリペプチドの異所性または制御されない細胞発現と関連する障害のスクリーニングおよび診断用キットを提供する。そのようなキットは、ヒト R E T 1 6 アレルのヌクレオチド配列の決定に用いることができる。キットは、増幅ベースのアッセイ、核酸プローブアッセイ、タンパク質核酸プローブアッセイ、抗体アッセイ、またはこれらアッセイの組み合わせの試薬および指示を含んでよい。

【 0 0 2 4 】

他の側面において本発明は、生物学的試料中の R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出する方法であって、工程 (a) 配列番号 2 または配列番号 4 をコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖を生物学的試料中の核酸物質にハイブリダイズさせてハイブリダイゼーション複合体を生成させ、ついで (b) 該ハイブリダイゼーション複合体を検出することを含み、その際、該複合体の存在が生物学的試料中の R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在と関連することを特徴とする方法を提供する。核酸物質は、ハイブリダイゼーションの前に複製連鎖反応によってさらに増幅することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明のさらに他の側面は、本明細書にさらに記載する種々の R E T 1 6 関連疾患、障害、または状態の遺伝的素因、罹病性および / または処置または治療への応答の検出方法を提供する。

【 0 0 2 6 】

本発明のさらなる側面、特色および利点は、発明の詳細な説明を読み、添付の図面と関連させて考慮したときに一層よく理解されるであろう。

【 0 0 2 7 】

本発明を種々の側面でより完全に記載するため、以下の定義を提供する。これら定義は手引きおよび説明に有用であることを意図したものであって、開示した本発明およびその態様を限定することを意図するものではない。

【 0 0 2 8 】

定義

R E T 1 6 ポリペプチド (またはタンパク質) とは、単離し、好ましくは実質的に精製した R E T 1 6 タンパク質のアミノ酸配列をいい、本発明に従ってヒト c D N A ライブラリー源から単離されるが、あらゆる種、好ましくは哺乳動物 (マウス、ラット、非ヒト霊長類を含む)、最も好ましくはヒトから、および様々な採取源 (天然、合成、半合成、または組換えを含む) から得ることができる。実際、本発明は、さらに詳細には、 (i) 完全長のヒト R E T 1 6 転写物のヒト R E T 1 6 ポリヌクレオチド配列 (配列番号 1) およびコードされたヒト R E T 1 6 ポリペプチド配列 (配列番号 2) (図 1 ~ 3) ; (ii) ヒト R E T 1 6 オープンリーディングフレームポリヌクレオチド配列 (配列番号 3) およびコードされたヒト R E T 1 6 ポリペプチド配列 (配列番号 4) ; (iii) マウス R E T 1 6 ポリヌクレオチド配列 (配列番号 6) およびコードされたマウス R E T 1 6 アミノ酸配列 (配列番号 7) (図 5 および 6) および ; (iv) ラット R E T 1 6 オースログの部分核酸配列 (配列番号 8) およびコードされたラット R E T 1 6 アミノ酸配列 (配列番号 9) (図 1 3 ~ 1 4) を提供する。本明細書に記載した R E T 1 6 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの機能性の断片および部分もまた本発明に包含される。

【 0 0 2 9 】

アゴニスト (たとえば、アクチベーター) とは、 R E T 1 6 ポリペプチドまたは機能性のその断片に結合したときに、 R E T 1 6 ポリペプチドの作用を増大または作用の持続を延ばす分子をいう。アゴニストとしては、 R E T 1 6 ポリペプチドに結合してその作用を変調するタンパク質、核酸、炭水化物その他の分子が挙げられる。アンタゴニスト (たとえ

10

20

30

40

50

ば、インヒビター)とは、RET16ポリペプチドまたは機能性のその断片に結合したときに、RET16ポリペプチドの生物学的または免疫学的活性の量または作用の持続を低減または排除する分子をいう。アンタゴニストとしては、RET16ポリペプチドの作用および/または機能を低減、低下または排除するタンパク質、核酸、炭水化物、抗体その他の分子が挙げられる。

【0030】

本明細書において「核酸配列」とは、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはポリヌクレオチド(たとえば、cDNA、DNA、RNA)、およびその断片または部分、およびゲノムまたは合成由来のDNAまたはRNAをいい、一本鎖または二本鎖であってよく、センスまたはアンチセンス鎖を表す。制限されない例として、断片としては、長さが約10~60ヌクレオチドよりも長い、好ましくは約20~60ヌクレオチドである核酸配列が挙げられ、好ましくは少なくとも70~100ヌクレオチドである断片が挙げられ、これはまた長さが少なくとも1000ヌクレオチドまたはそれ以上であってもよい。プローブまたはプライマーとして使用する核酸は、本明細書に記載のものと長さが異なっていてよい。

10

【0031】

同様に、本明細書において「アミノ酸配列」とは、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列、その断片または部分をいい、天然または合成分子をいう。アミノ酸配列断片は、一般に長さが約4または5~約35、好ましくは約5~約15または25アミノ酸であり、最適にはRET16ポリペプチドの生物学的活性または機能を保持している。しかしながら、目的に応じて一層大きなアミノ酸断片、たとえば約15~約50または60アミノ酸の断片を使用可能であることが理解されるであろう。

20

【0032】

本明細書において天然のタンパク質分子のアミノ酸配列に対して「アミノ酸配列」という場合、「アミノ酸配列」などの術語、たとえば「ポリペプチド」や「タンパク質」は、該アミノ酸配列を指称したタンパク質分子に関係する完全で天然のアミノ酸配列に限定することを意図するものではない。さらに、RET16ポリペプチドおよびRET16タンパク質なる術語は、本発明のRET16核酸配列のコードされた生成物をいうものとして、しばしば相互に交換可能に用いられる。

【0033】

RET16ポリペプチドの変異体は、1またはそれ以上のアミノ酸が変化したアミノ酸配列をいう。変異体は「保存された」変化を有してよく、その場合はたとえばロイシンをイソロイシンで置換する場合のように置換されるアミノ酸は類似の構造的または化学的特性を有する。より稀には、変異体は「保存されない」変化、たとえばグリシンのトリプトファンによる置換を有してよい。より少ない変異としては、アミノ酸欠失または挿入、およびその両者が挙げられる。機能的な生物学的または免疫学的活性を損なうことなくどのアミノ酸残基を置換、挿入または欠失できるかを決定する手引きは、当該技術分野でよく知られたコンピュータープログラム、たとえばDNASTARソフトウェアを用いて見出すことができる。

30

【0034】

アレルまたはアレル配列は、RET16核酸配列の別の形態である。アレルは、核酸配列中の少なくとも1の変異の結果生じ、変化したmRNAまたはポリペプチド(その構造または機能は変化しているかまたは変化していない)を生成する。天然のものか組換えのものかに拘わらず、いかなる遺伝子もアレル形を有しないか、または1または多くのアレル形を有し得る。アレルに生じる一般的な変異による変化は、一般にヌクレオチドの天然の欠失、付加または置換に帰する。これら変化の各々は、所定の配列において単独で、または他の変化とともに、1回またはそれ以上生じる。

40

【0035】

RET16ポリペプチドをコードする変化した核酸配列は、同じまたは機能的に同等のRET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドという結果となる異なるヌクレオチ

50

ドの欠失、挿入および/または置換を含む核酸配列を包含する。変化した核酸配列はさらに、RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの多型を包含する；そのような多型は、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することができてもよいしまたは検出できなくともよい。コードされたタンパク質はまた、サイレントな変化を生成し、本発明の機能的に同等のRET16タンパク質という結果となるアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含んでいてよい。RET16タンパク質の生物学的活性または機能が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解性、ハイドロフォビシティー、ハイドロフィリシティー、および/または両親媒性の性質の類似性に基づいて意図的なアミノ酸置換を行うことができる。たとえば、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれ、正に荷電したアミノ酸にはリシンおよびアルギニンが含まれ、類似のハイドロフィリシティー値を有する非電荷の極性頭部基を有するアミノ酸にはロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；セリンおよびトレオニン；およびフェニルアラニンおよびチロシンが含まれる。

10

【0036】

「ペプチド核酸」(PNA)とは、アミノ酸残基のペプチド骨格(リシンで終わる)に連結したオリゴヌクレオチド(「オリゴ」)を含むアンチセンス分子またはアンチジーン因子(anti-gene agent)をいう。PNAは一般に、アミノ酸残基に連結した少なくとも5ヌクレオチドのオリゴを含む。これら小さな分子は、核酸の相補鎖に結合することによって転写の伸長を停止させる(P. E. Nielsenら、1993, Anticancer Drug Des., 8: 53-63)。PNAは、ポリエチレングリコール処理して(pegylated)細胞内での寿命を延ばす

20

【0037】

オリゴヌクレオチドまたはオリゴマー(「オリゴ」)とは、典型的に少なくとも約6ヌクレオチドから約60ヌクレオチド、好ましくは長さが少なくとも約8~10ヌクレオチド、さらに好ましくは長さが少なくとも約12ヌクレオチド、たとえば約15~35ヌクレオチド、または約15~25ヌクレオチド、または約20~35ヌクレオチドの連続したヌクレオチドを好ましくは含む核酸配列をいい、典型的にたとえばPCR増幅アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイまたはマイクロアレイにおいてプローブまたはプライマーとして用いることができる。オリゴヌクレオチドなる語は、当該技術分野で一般に定義されるプライマー、プローブまたはアンプリマーなる語と実質的に同等であることが理解されるであろう。また、より長いオリゴヌクレオチドプローブ、またはプローブの混合物、たとえば縮重プローブを、より長く一層複雑な核酸配列、たとえばゲノムDNAを検出するのに用いることができることも当業者には理解されるであろう。そのような場合、プローブは少なくとも20~200ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30~100ヌクレオチド、さらに好ましくは50~100ヌクレオチドを含んでいてよい。

30

【0038】

増幅とは核酸配列のさらなるコピーの産生をいい、一般に複製連鎖反応(PCR)法を用いて行うことができる。PCR法は当該技術分野でよく知られている(D. W. DieffenbachおよびG. S. Dveksler, 1995, PCR Primer, a Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、プレインビュー、ニューヨークを参照)。

40

【0039】

マイクロアレイは、基体上、たとえば紙、ナイロン、または他のタイプのメンブレン；フィルター；チップ；ガラススライド；または他のタイプの適当な固体支持体上に合成した別個のポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのアレイである。

【0040】

アンチセンスとは、特定のDNAまたはRNA配列に相補的なヌクレオチド配列および核酸配列を含む組成物をいう。「アンチセンス鎖」なる語は、「センス」鎖に相補的な核酸鎖を参照する際に用いる。アンチセンス(すなわち相補的な)核酸分子としてはPNAが挙げられ、合成および転写を含むいかなる方法によっても製造することができる。細胞内に導入されると、相補的なヌクレオチドは細胞によって産生された天然の配列に結合して

50

二本鎖を形成し、これが転写かまたは翻訳のいずれかを妨害する。「マイナス」の表示がアンチセンス鎖を参照して時々用いられ、「プラス」はセンス鎖を参照して時々用いられる。

【0041】

コンセンサスとは、一連の関連するDNA、RNA、またはタンパク質の配列の各位置での塩基またはアミノ酸の最も共通した選択を反映する配列をいう。特に良好な一致を示す領域は、しばしば保存された機能性のドメインを表している。

【0042】

欠失とは、ヌクレオチド配列かまたはアミノ酸配列のいずれかにおける変化をいい、1またはそれ以上のヌクレオチド残基またはアミノ酸残基の不在という結果となるものをいう。対照的に、挿入（「付加」ともいう）とは、天然分子と比較して1またはそれ以上のヌクレオチド残基またはアミノ酸残基の付加という結果となるヌクレオチド配列またはアミノ酸配列における変化をいう。置換とは、1またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の異なるヌクレオチドまたはアミノ酸による置き換えをいう。

10

【0043】

誘導体核酸分子とは、コードされたRET16ポリペプチドをコードするまたはコードされたRET16ポリペプチドに相補的な核酸の化学的修飾をいう。そのような修飾としては、たとえば、水素原子のアルキル、アシル、またはアミノ基による置換が挙げられる。核酸誘導体は、天然分子の必須の生物学のおよび/または機能的な特徴を保持したポリペプチドをコードする。誘導体ポリペプチドは、グリコシル化、ポリエチレングリコール処理（pegylation）、またはそれが由来するポリペプチドの生物学のおよび/または機能的または免疫学的活性を保持する同様のプロセスによって修飾したものである。

20

【0044】

「生物学的に活性な」（すなわち機能性の）とは、天然分子の構造的、制御的、または生化学的な機能を有するタンパク質またはポリペプチドまたはそのペプチド断片をいう。同様に、「免疫学的に活性な」とは、天然、組換えまたは合成のRET16またはそのオリゴペプチドが適当な動物または細胞において特異的な免疫応答を引き起こす能力、たとえば抗体を産生させ、特定の抗体に結合する能力をいう。

【0045】

ハイブリダイゼーションとは、核酸の鎖が相補鎖に塩基対形成により結合するプロセスをいう。

30

【0046】

「ハイブリダイゼーション複合体」とは、相補的なGおよびC塩基間および相補的なAおよびT塩基間の水素結合の形成により2つの核酸配列間で生成する複合体をいう。水素結合は塩基スタッキング相互作用によりさらに安定化することができる。2つの相補的な核酸配列は、逆平行の立体配置で水素結合を形成する。ハイブリダイゼーション複合体は、溶液中で形成することができ（たとえば、C₀tまたはR₀t分析）、または溶液に存在する一方の核酸配列と固体支持体（たとえば、メンブレン、フィルター、チップ、ピン、またはガラススライド、または細胞またはその核酸を付着した他の適当な基体）上に固定化した他方の核酸配列との間で形成することができる。

40

【0047】

ストリンジェンシーまたはストリンジェントな条件とは、核酸組成、塩および温度によって定められるハイブリダイゼーションの条件をいう。これら条件は当該技術分野でよく知られており、試料中の同一または関連するポリヌクレオチド配列を同定および/または検出すべく変更することができる。低い、中くらいまたは高いストリンジェンシーを含む様々な等価な条件は、配列の長さおよび性質（DNA、RNA、塩基組成）、反応環境（溶液中または固相基体上に固定化）、標的核酸の性質（DNA、RNA、塩基組成）、塩の濃度および他の反応成分（たとえば、ホルムアミド、デキストラン硫酸および/またはポリエチレングリコール）の存在または不在および反応温度（プローブの融解温度より約5低い温度から融解温度より約20 ~ 25低い温度の範囲内）などの因子に依存する

50

。1 またはそれ以上の因子を変化させることにより、以前の条件とは異なるが同等の条件（低いまたは高いストリンジェンシー）を生成することができる。

【0048】

当業者には理解されるであろうように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは同一または関連するポリヌクレオチド配列を同定または検出するために変更することができる。熟練した実施者によってさらに評価されるであろうように、 T_m は幾つかのパラメータ、たとえばハイブリッドまたはプローブのヌクレオチド数の長さ、またはハイブリダイゼーション緩衝液の成分および条件などに依存して、当該技術分野で知られた等式により近似することができる（たとえば、T. Maniatisら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1982 および J. Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989；Current Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubelら編、Vol. 1, "Preparation and Analysis of DNA"、John Wiley and Sons, Inc., 1994-1995、補遺 26, 29, 35 および 42；pp. 2.10.7-2.10.16；G. M. Wahl および S. L. Berger (1987；Methods Enzymol. 152: 399-407)；および A. R. Kimmel, 1987；Methods of Enzymol. 152: 507-511 を参照)。一般的な手引きとして、 T_m は配列ホモロジーが 1% 下がる毎に約 1 ~ 1.5 下がる。また、一般にハイブリッドの安定性はナトリウムイオン濃度および温度の関数である。典型的に、ハイブリダイゼーション反応は最初は低いストリンジェンシーの条件下で行い、ついで異なる、しかしより高いストリンジェンシーで洗浄する。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー、たとえば高い、中くらい、または低いストリンジェンシーへの言及は、一般にそのような洗浄条件に関する。

【0049】

それゆえ、制限されない例として、高いストリンジェンシーとは、0.018 M NaCl 中、約 65 で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件をいう（すなわち、ハイブリッドが 0.018 M NaCl 中、約 65 で安定でないなら、それは高いストリンジェンシー条件下で安定ではないであろう）。高いストリンジェンシー条件は、たとえば、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE（食塩水リン酸ナトリウム EDTA）（1×SSPE 緩衝液は 0.15 M NaCl、10 mM Na_2HPO_4 、1 mM EDTA を含む）、（または 150 mM NaCl、15 mM クエン酸 $\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.0 を含む 1×SSC 緩衝液）、0.2% SDS 中、約 42 でハイブリダイゼーションし、ついで 1×SSPE（または食塩水クエン酸ナトリウム、SSC）および 0.1% SDS 中、少なくとも約 42、好ましくは約 55、さらに好ましくは約 65 の温度にて洗浄することにより提供することができる。

【0050】

中くらいのストリンジェンシー条件とは、制限されない例として、50%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE（または SSC）、0.2% SDS 中、42（から約 50）でハイブリダイゼーションすることができ、ついで 0.2×SSPE（または SSC）および 0.2% SDS 中、少なくとも約 42、好ましくは約 55、さらに好ましくは約 65 の温度にて洗浄することのできる条件をいう。

【0051】

低いストリンジェンシー条件とは、制限されない例として、10%ホルムアミド、5×デンハルト溶液、6×SSPE（または SSC）、0.2% SDS 中、42 でハイブリダイゼーションすることができ、ついで 1×SSPE（または SSC）および 0.2% SDS 中、少なくとも約 45、好ましくは約 50 の温度にて洗浄することのできる条件をいう。

【0052】

さらなるストリンジェンシー条件については T. Maniatisら、Molecular Cloning: A Labo

10

20

30

40

50

ratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク(1982)を参照のこと。低い、中くらいおよび高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション/洗浄条件は、熟練した実施者によく知られ実施されている種々の成分、緩衝液および温度を用いて変えることができることが理解されなければならない。

【0053】

相補的なまたは相補性とは、許容される塩および温度の条件下での塩基形成によるポリヌクレオチドの天然の結合をいう。たとえば、配列「A-G-T」は相補的配列「T-C-A」に結合する。2つの一本鎖分子間での相補性は「部分的」であってよく、その場合は核酸の一部のみが結合し、あるいは一本鎖間に全体にわたる相補性が存在するときには相補性は完全なものである。核酸鎖間の相補性の程度は、核酸鎖間でのハイブリダイゼーションの効率および強度に対して有意の影響を及ぼす。このことは、PNA分子のデザインおよび使用の場合と同様、増幅反応(核酸鎖間の結合に依存する)において特に重要である。

10

【0054】

ホモロジーとは相補性の程度をいう。部分的な配列ホモロジーまたは完全なホモロジーがあり、完全なホモロジーは同一性、たとえば100%同一性と同等である。同一配列が標的核酸にハイブリダイズするのを少なくとも部分的に抑制する部分的に相補的な配列は、機能的な用語「実質的に相同な」を用いて表す。完全に相補的な配列の標的配列へのハイブリダイゼーションの抑制は、低いストリンジェンシー条件下、ハイブリダイゼーションアッセイ(たとえば、サザンまたはノーザンブロット、溶液ハイブリダイゼーションなど)を用いて調べることができる。実質的に相同な配列またはプローブは、低いストリンジェンシー条件下、完全に相同な配列またはプローブの標的配列への結合(すなわち、ハイブリダイゼーション)と競合または抑制するであろう。にも拘わらず、低いストリンジェンシーの条件は非特異的な結合を可能にはしない;低いストリンジェンシー条件では、2つの配列の結合が互いに特異的な(すなわち、選択的な)相互反応である必要がある。非特異的な結合の欠如は、相補性の部分的な程度さえも欠いている(たとえば、約30%未満の同一性)第二の標的配列を用いることによって試験することができる。非特異的な結合の不在下、プローブは第二の非相補的な標的配列にハイブリダイズしないであろう。

20

【0055】

当業者であれば、当該技術分野で知られているように、たとえばCLUSTALWコンピュータプログラム(J. D. Thompsonら、1994, Nucleic Acids Research, 2(22): 4673-4680)またはFASTDB(Brutlagら、1990, Comp. App. Biosci., 6: 237-245)に基づくものなどのアルゴリズムを用いて配列間のパーセント同一性を決定する方法を知っているであろう。FASTDBアルゴリズムは典型的にその計算において配列の内部のマッチングしない欠失または付加(すなわち、ギャップ)を考慮していないが、このことは%同一性を過度に評価するのを避けるべく人為的に補正することができる。しかしながら、CLUSTALWはその同一性の計算においてギャップを考慮に入れている。

30

【0056】

BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズム(Altschulら、1977, Nuc. Acids Res., 25: 3389-3402およびAltschulら、1990, J. Mol. Biol., 215: 403-410)もまた当業者に利用できる。核酸配列用のBLASTNプログラムは、デフォルトとしてワードレンクス(wordlength; W)11、エクスペクテーション(expectation; E)10、M=5、N=4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムは、デフォルトとしてワードレンクス(W)3、およびエクスペクテーション(E)10を使用する。BLOSUM62スコアリングマトリックス(Henikoff & Henikoff, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 10915)は、アラインメント(B)50、エクスペクテーション(E)10、M=5、N=4、および両鎖の比較を使用する。

40

【0057】

所定のポリヌクレオチド配列を含む組成物とは、広く該所定のポリヌクレオチド配列を含

50

むあらゆる組成物をいう。組成物は乾燥した調合物または水性の溶液を包含する。RET 16 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列（配列番号 1 または配列番号 3）またはその断片を含む組成物は、ハイブリダイゼーションプローブとしてまたはプライマーとして用いることができる。プローブおよびプライマーは凍結乾燥した形態で貯蔵することができ、炭水化物などの安定化剤と混合することができる。ハイブリダイゼーションではプローブは、塩（たとえば、NaCl）、界面活性剤（たとえば、SDS）および他の成分（たとえば、デンハルト溶液、粉乳、サケ精子DNA など）を含む水溶液中で用いることができる。

【0058】

「実質的に精製した」とは、核酸配列またはアミノ酸配列をその天然環境から種々の手段により除去、すなわち単離または分離し、天然の状態では結合していた他の成分を少なくとも 60% 含まない、好ましくは 75% ~ 85% 含まない、最も好ましくは 90% またはそれ以上含まないことをいう。 10

【0059】

試料または生物学的試料の語は、その最も広義で解釈されることを意図する。RET 16 タンパク質をコードする核酸またはその断片、または RET 16 タンパク質自体を含むと思われる生物学的試料としては、体液、細胞または組織からの抽出物、細胞から単離した染色体（たとえば、中期染色体のスプレッド（spread））、オルガネラ、または細胞から単離した膜、細胞、ゲノム DNA（溶液中のもの、またはサザン分析のように固相支持体に結合したもの）、RNA（溶液中のもの、またはノーザン分析のように固相支持体に結合したもの）、cDNA（溶液中のもの、または固相支持体に結合したもの）などの核酸、組織、組織プリントなどが挙げられる。 20

【0060】

形質転換とは、外来 DNA がレシピエント細胞に入り変化させるプロセスをいう。形質転換は、当該技術分野でよく知られた種々の方法を用いて天然または人為的な条件下で行うことができる。形質転換は、異種核酸配列を原核または真核宿主細胞に挿入する既知の方法に依存して行うことができる。この方法は、形質転換すべき宿主細胞の種類に基づいて選択し、ウイルス感染、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクシン、および部分衝撃（partial bombardment）が挙げられるが、これらに限られるものではない。そのような「形質転換した」細胞には、挿入 DNA が自己複製プラスミドとしてかまたは宿主染色体の一部として複製できる安定に形質転換した細胞が含まれる。形質転換した細胞にはまた、挿入 DNA または RNA を限られた期間のみ一過性に発現する細胞も含まれる。 30

【0061】

「ミメチック」とは、その構造を RET 16 タンパク質またはその部分の構造に関する知見に基づいて開発した分子をいい、そのようなものとして RET 16 タンパク質の作用の一部または全てを奏することができる。

【0062】

タンパク質に関連して「部分」（「所定のタンパク質の部分」のように）とは、該タンパク質の断片またはセグメント、たとえばペプチドをいう。断片は、サイズが 4 または 5 アミノ酸残基のものから全体のアミノ酸配列から 1 のアミノ酸を差し引いたものまでの範囲にわたる。それゆえ、「配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸配列の少なくとも部分を含む」タンパク質は、完全長の RET 16 ポリペプチド、および完全長の RET 16 の断片またはセグメントを包含する。 40

【0063】

抗体とは、完全な分子並びにエピトープまたは抗原決定基に結合することのできる Fab、F(ab')₂、Fv などのフラグメントをいう。RET 16 ポリペプチドに結合する抗体は、完全なポリペプチド、または目的とする小さなペプチドを含むまたは免疫用抗原として組換えにより調製した断片を用いて調製することができる。動物の免疫に使用するポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNA の転移（transition）から得るかまたは化学 50

的に合成することができ、所望なら担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。ペプチドに化学的に結合させるために一般に使用される担体としては、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、およびチログロブリンが挙げられる。ついで、結合したペプチドを用いて動物(たとえば、マウス、ラット、またはウサギ)を免疫する。

【0064】

「ヒト化」抗体とは、ヒト抗体に一層近似させるために非抗原結合領域のアミノ酸を置換しながら元々の抗原結合能は保持している抗体分子をいい、たとえばC. L. Queenらの米国特許第5,585,089号に記載されている。

【0065】

抗原決定基とは、特定の抗体と接触する分子の部分(すなわち、エピトープ)をいう。タンパク質またはタンパク質の断片を用いて宿主動物を免疫する場合、該タンパク質の多くの領域が該タンパク質上の所定の領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘発することができる;これら領域または構造を抗原決定基という。抗原決定基は、抗体への結合に対して完全な抗原(すなわち、免疫応答を誘発するのに用いた免疫原)と競合することができる。

【0066】

「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、タンパク質またはペプチドと結合性分子、たとえばアゴニスト、アンタゴニスト、または抗体との相互作用をいう。相互作用は、結合性分子によって認識されるタンパク質の特定の構造(たとえば、抗原決定基またはエピトープ、または構造的な決定基)の存在に依存する。たとえば、抗体がエピトープ「A」に特異的であるなら、標識した「A」および該抗体を含む反応液中のエピトープA(または遊離の非標識のA)を含むタンパク質の存在は、標識したAの該抗体への結合を低減させるであろう。

【0067】

「ポリヌクレオチドの発現と相関関係がある」とは、配列番号1または配列番号2と類似のリボ核酸の存在のノーザン分析による検出が、試料中のRET16ポリペプチドをコードするmRNAの存在を示し、それによって該タンパク質をコードするポリヌクレオチドからの転写物の発現と相関関係があることをいう。

【0068】

配列番号1または配列番号2のポリヌクレオチドにおける変更には、RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの配列におけるあらゆる変更が含まれ、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて検出できる欠失、挿入、および点変異が含まれる。この定義に含まれるのは、RET16ポリペプチドをコードするゲノムDNAの変更の検出(たとえば、配列番号1または配列番号3にハイブリダイズすることのできる制限断片長多型のパターンの変化により)、配列番号1または配列番号3の選択した断片がゲノムDNAの試料にハイブリダイズできないこと(たとえば、アレル特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用い)、およびRET16タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列の正常な染色体遺伝子座以外の遺伝子座へのハイブリダイゼーションのような不適切または予期しないハイブリダイゼーション(たとえば、中期染色体スプレッドへの蛍光インシトゥハイブリダイゼーション(FISH)を用い)である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0069】

本発明は、RET16ポリヌクレオチドおよびコードしたポリペプチドに関する。特に本明細書に記載しているのはRET16(本明細書ではRET16.1ともいう)および変異体RET16.2およびRET16.3である。「RET16」との言及はすべて、特に断らない限り、RET16(RET16.1)、RET16.2およびRET16.3に適用されるものとする。

【0070】

本明細書に記載する新規なRET16遺伝子は、TNF刺激したヒト肺微細血管内皮細胞

10

20

30

40

50

で発現され、アップレギュレーションされることがわかった。本発明に従い、TNF刺激したヒト肺微細血管内皮細胞で発現されたRNAを分析して、細胞制御事象に関与すると思われる遺伝子産物を同定した。静止細胞をTNF-アルファで1時間刺激し、該細胞からRNAを単離した。単離したRNAから、当業者に知られ用いられている常法を用いて相補的DNA(cDNA)を製造した。微細血管内皮細胞をTNF-アルファで刺激した後にアップレギュレーションされたcDNAを、サブトラクティブハイブリダイゼーションを用いて同定した(実施例1参照)。このアプローチで同定したポリヌクレオチドcDNAを、以下に記載するようにシグナル伝達カスケードでの可能な役割について評価した。

【0071】

従って、本明細書に記載のRET16遺伝子の役割をアンチセンス戦略を用いて特徴付けた(実施例5および6参照)。この目的のため、細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクションし、TNF-アルファで刺激した。RET16 RNAを抑制できるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、RNA発現を妨害できるオリゴを選択すべく評価した。最も活性なRET16遺伝子アンチセンスは、下記配列：

UGCACAUGCCGCCAAGGAGCCAUUCU(配列番号16)

を有する11587オリゴであることがわかった。この11587オリゴはトランスフェクションした細胞の表面上のE-セレクチンタンパク質のアップレギュレーションを抑制したので、RET16の細胞シグナル伝達カスケードでの役割が示唆された(実施例6および図9)。RET16遺伝子のRNAレベルの低減は、細胞内でのRET16タンパク質レベルを低減させると推定される。それゆえ、細胞内でのRET16タンパク質レベルの低減はTNF-アルファシグナル伝達カスケードを妨害でき、細胞表面でのE-セレクチンの発現の低減という結果となった。

【0072】

実施例6に記載し、図9に示すように、RET16ポリヌクレオチドに対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドはTNF-刺激したHMVEC細胞でのE-セレクチン発現の有意の抑制という結果となった。これら結果は、RET16が直接かまたは間接的にE-セレクチン発現を少なくとも変調していることを意味している。好ましくは、これら結果は、RET16がE-セレクチン(多くの炎症性疾患と関連していることが当該技術分野で知られている)の正のモデュレーターを表していることを示している。それゆえ、以下にさらに検討するように、RET16のアンタゴニストは炎症性疾患の治療、予防、および/または改善に有用である。

【0073】

さらに、本発明に従えば、RET16に対して向けられたアンチセンスオリゴヌクレオチドはまたV-cam発現の抑制という結果となった。これら結果は、RET16が直接かまたは間接的にV-cam発現を少なくとも変調していることを意味している。好ましくは、これら結果は、RET16がV-camの正のモデュレーターを表していることを示している。

【0074】

E-セレクチンは炎症状態の正のマーカーを表しており(D. J. Lefer, 2000, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 40: 283-94; A. BlannおよびM. Seigneur, 1997, Clin. Hemorheol. Microcirc., 17(1): 3-11)、種々の細胞および組織細胞型の細胞外膜上で発現されるE-セレクチンが増大している。この関係は、血管内皮細胞上で循環白血球の細胞ローリング(rolling)を変調するうえで果たしているE-セレクチンの役割によって媒体される。可溶性のE-セレクチンおよびV-camの発現もまた、炎症性疾患と関係している(A. J. GearingおよびW. Newman, 1993, Immunol. Today, 14(10): 506-12)。最近の研究は、E-セレクチンおよびV-camの発現が喘息の発症、特に重篤な喘息の発症と関係することを示している(A. Hamzaouiら、2001, Am. J. Inflamm., 10(6): 339-42)。

【0075】

10

20

30

40

50

さらに、E - セレクチンは若年性特発性関節炎の発症と関係していることが示されている (C. Y. Chenら、2002, *Ann. Rheum. Dis.*, 61(2): 167-70)。E - セレクチンはまた、腫瘍細胞の造血性転移の発症と関係付けられている (K. Itoら、2001, *J. Gastroenterol.*, 36(12): 823-9) ; E - セレクチンは、高インスリン血症および2型糖尿病の発症と関係付けられている (B. R. Winkelmannら、2001, *Curr. Med. Res. Opin.*, 17(2): 132-4 ; およびG. Targherら、2001, *Diabetes Care*, 24(11): 1961-6) ; E - セレクチンは、アテローム性動脈硬化症および心血管性疾患と関係付けられている (E. Demerathら、2001, *Ann. Hum. Biol.*, 28(6): 664-78) ; E - セレクチンおよびV - c a mは、一般におよび特に結腸癌の腫瘍の進行および転移と関係付けられている (D. Alexiouら、2001, *Eur. J. Cancer*, 37(18): 2392-7) ; E - セレクチンは、ヴェーゲナー肉芽腫症の発症と関係付けられている (N. Ohtaら、2001, *Auris. Nasus. Larynx.*, 28(4): 311-4) ; E - セレクチンおよびV - c a mは、幹細胞移植の合併症の発症と関係付けられている (Y. Matsudaら、2001, *Bone Marrow Transplant.*, 27(9): 977-82) ; E - セレクチンおよびV - c a mは、サラセミアの発症と関係付けられている (D. S. Kyriakouら、2001, *Ann. Hematol.*, 80(10): 577-83) ; E - セレクチンは、アテローム性動脈硬化症の発症と関係付けられている (C. M. Ballantyne, 2001, *Clin. Cardiol.*, 24(8補遺): III 13-7) ; E - セレクチンは、自己免疫疾患の発症と関係付けられている (R. W. McMurray, 1996, *Semin. Arthritis. Rheum.*, 25(4): 215-33) ; E - セレクチンは、アテローム性動脈硬化症、虚血 - 再灌流障害、急性肺障害、慢性関節リウマチ、および移植拒絶の発症と関係付けられている (M. P. Bevilacquaら、1994, *Ann. Rev. Med.*, 45: 361-78) ; およびE - セレクチンは、アレルギー性炎症の発症と関係付けられている (C. H. Smithら、1993, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148(6 Pt2): S75-8)。それゆえ、RET16ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、RET16の断片またはアンタゴニストも含めて、上記障害の治療、予防、および/または改善に有用である。

10

20

30

40

50

【0076】

E - セレクチンの多型形態もまた幾つかの疾患および障害と関係付けられている。たとえば、A561C E - セレクチン多型は、全身性エリテマトーデスと関係付けられている (Magadmiら、2001, *J. Rheumatol.*, 28(12): 2650-2) ; E - セレクチンS128R多型は、冠状動脈石灰化と関係付けられている (D. L. Ellsworthら、2001, *J. Mol. Med.*, 79(7): 390-8) ; およびさらなるE - セレクチン多型が、虚血性心疾患の発症と関係付けられている (F. Andreottiら、2002, *Heart.*, 87(2): 107-12)。それゆえ、RET16ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、RET16の断片またはアンタゴニストも含めて、上記障害の治療、予防、および/または改善に有用である。

【0077】

本発明は、その態様の一つにおいて、図2および3に示す配列番号2のアミノ酸配列または図4Bに示す配列番号4のアミノ酸配列を含むヒトRET16ポリペプチドに関する。RET16ポリペプチド産物は長さが476アミノ酸である(配列番号2、図2)。ヒトRET16ポリペプチドは、図10Eに示すようにPodospira anserina H e t - e - 1タンパク質の部分と31%の同一性、およびThermomonospora curvata P K W Aタンパク質の部分と33%の同一性を有する。さらに、本明細書に記載するようにヒトRET16の完全長マウスオーソログおよび部分ラットオーソログが同定された。たとえば、図5および6は、それぞれマウスRET16オーソログ核酸配列(配列番号6)およびコードされたアミノ酸配列(配列番号7)を示す。図13は部分ラットRET16オーソログの核酸配列(配列番号8)を示し、図14は部分ラットRET16オーソログのコードされたアミノ酸配列(配列番号9)を示す。

【0078】

RET16アミノ酸配列は、SEQWEB GCGにおいてMOTIFSプログラムを用いて他の既知のタンパク質と共通する幾つかの配列モチーフを含んでいることがわかった。MOTIFSは、PROSITEディクショナリーに記載されている規則的な発現パターンについてタンパク質配列を探索することによってタンパク質モチーフを調べる。RE

T 1 6 は、アミノ酸位置 1 5 0、3 6 5、4 6 0 に 3 つの潜在的なアスパラギングリコシル化部位を含んでいる。さらに、R E T 1 6 アミノ酸配列は、潜在的な環状アデノシンーリン酸 (アミノ酸 4 4 1 および 4 4 2)、カゼインキナーゼ II (アミノ酸 7、3 8、1 3 6、1 5 9、1 6 4、1 8 4、1 9 4、2 6 8、3 3 3、および 3 7 0)、およびプロテインキナーゼ C (アミノ酸 3 3、3 8、1 2 8、1 3 6、1 7 5、4 3 9、4 6 2) リン酸化部位を含んでいる。

【 0 0 7 9 】

R E T 1 6 アミノ酸配列を用い、他のタンパク質ドメインについて P F A M - H M M データベースを探索した。P F A M - H M M データベースはタンパク質ファミリーおよびドメインのコレクションであり、多彩なタンパク質アラインメントを含んでいる (A. Bateman ら、1999, *Nucleic Acids Research*, 27: 260-262)。1 つのステリルアルファモチーフ (S A M) ドメインに加え、7 つの潜在的な W D 4 0、ベータ - トランスデュースン (G - ベータ) リピートが同定された (図 7)。

10

【 0 0 8 0 】

ベータ - トランスデュースン (G - ベータ) は、グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (G タンパク質; 膜貫通レセプターによって生成されたシグナルの伝達の媒介体として作用する) の 3 つのサブユニット (アルファ、ベータ、およびガンマ) の一つである。構造的には G - ベータは 8 つの約 4 0 残基のタンデムリピートからなり、各リピートは中央に T r p - A s p モチーフを含んでいる (このタイプのリピートは、しばしば W D - 4 0 リピートと呼ばれる)。そのような繰返しセグメントは、他の多数のタンパク質 (G - ベータ様ペプチド、酵母 S T E 4、M S I 1、C D C 4、C D C 2 0、M A K 1 1、P R P 4、P W P 1 および T U P 1、粘菌 A A C 3 およびコロニン (coronin)、およびシヨウジョウバエ Groucho タンパク質を含む) にも存在することが示されている。これらタンパク質内のリピートの数は、5 (P R P 4、T U P 1、および Groucho) から 8 (G - ベータ、S T E 4、M S I 1、A A C 3、C D C 4、P W P 1 など) にわたる。G - ベータおよび G - ベータ様タンパク質ではリピートは配列の全体の長さにわたって分布するが、他のタンパク質ではリピートは、N 末端、中央、または C 末端部分に含まれる (E. J. Neer ら、1994, *Nature*, 371: 297-300)。

20

【 0 0 8 1 】

ステリルアルファモチーフ (S A M) ドメインは、多くの生物学的プロセスに關与する広範な様々なタンパク質に存在する推定のタンパク質相互作用モジュールである。約 7 0 残基の S A M ドメインが様々な真核生物に認められる。S A M ドメインは、低い結合親和性でだがホモおよびヘテロオリゴマー形成し、特定のタンパク質 - タンパク質相互作用を媒体することが示されている。構造的分析は、S A M ドメインが 2 つの大きな界面とともに小さな 5 ヘルックスの束にて配置されることを示している。E p h チロシンキナーゼ E p h B 2 の S A M ドメインの場合は、これら界面はそれぞれ二量体を形成できる。これら 2 つの別個の結合表面の存在は、S A M ドメインが伸長した重合構造を形成できることを示唆している (D. Stapleton ら、1999, *Nature Struct. Biol.*, 6: 44-49)。

30

【 0 0 8 2 】

Incyte Genomics Lifeseq Gold データベースを用い、R E T 1 6 の予備的発現分析を行った。Incyte データベースでの電子ノーザンによれば (テンプレート I D 1 5 8 9 2 3 . 9 ; クローン I D 3 1 1 1 1 2 7)、R E T 1 6 遺伝子配列は 5 6 の c D N A ライブラリーで同定された。R E T 1 6 遺伝子を発現することがわかったこれらライブラリーを図 1 2 に示す。特に興味もたれることには、R E T 1 6 は幾つかの腫瘍組織 (腎臓、前立腺、下垂体、食道、卵巣、膀胱、肺、結腸、パラガングリオン、副腎、肝臓、子宮、および膵臓組織からのものを含む) で発現されることがわかった。さらに、R E T 1 6 は以下の疾患状態からの組織で発現されることがわかった: ハンチントン病、白血病、胆石症、癩癩、慢性潰瘍性大腸炎、アルツハイマー病、およびリンパ球性甲状腺炎。特に注目すべきことに、R E T 1 6 は、2 0 % の煙で 2 0 時間処理した気管支上皮細胞、C D 3 抗体で処理した C D 4 + T リンパ球、1 μ M の 5 - アザ - 2 ' - デオキシシチジンで処理した K -

40

50

562 慢性骨髄性白血病前駆細胞株、および I L - 5 で処理した臍帯単核球で発現されることがわかった。

【0083】

本発明の他の態様は、ヒト R E T 1 6 (h u R E T 6) 遺伝子のマウスオーソログ、すなわち m u R E T 1 6 を包含する。h u R E T 1 6 のマウスオーソログを同定するため、h u R E T 1 6 のコード配列を用いてマウス E S T データベース [ベーシックローカルアライメントサーチツール (B L A S T) 分析を行うために当業者に利用できる] を探索した。以下のマウス E S T が同定された: A U 0 3 5 6 9 3、A A 1 1 8 7 1 8、A A 2 0 4 6 0 8、W 4 1 0 5 6、A W 1 4 6 0 1 8、A I 4 5 0 4 9 5、A I 8 7 5 4 4 3、A I 3 1 6 5 4 4、A W 4 9 4 7 9 6、A W 1 4 6 0 1 8 および B E 9 8 3 8 9 0。m u R E T 1 6 核酸配列 (配列番号 6) は、h u R E T 1 6 と 8 0 % の同一性を有する。コードされた m u R E T 1 6 アミノ酸配列 (配列番号 7) は、h u R E T 1 6 と 8 2 . 5 % の同一性 (8 6 . 5 % の類似性) を有する。m u R E T 1 6 は 7 つの予測された W D リピートおよび 1 の S A M ドメインを有し、全て > 1 0 のスコアを有する。

10

【0084】

R E T 1 6 のカルボキシル末端は、 $1.78e-23$ のヒドンマルコフモデル (Hidden Markov Model) E 値に基づいて決定されるように、U ボックスドメインを含む。R E T 1 6 の U ボックスドメインとタンパク質 P R P 1 9 の U ボックス (S. C. Cheng ら、1993, Mol. Cell. Biol., 13(3): 1876-82) とのホモロジーおよびコンセンサス残基のアライメントを図 21 に示す (保存された残基の注釈は Aravind および Koonin, 2001, Current Biology, 10(4): R132-R134 から改変した)。P R P 1 9 は、U ボックスに加えて W D 4 0 リピートを含む プレ m R N A スプライシング 因子である。

20

【0085】

U F D 2 を典型例とする U ボックスドメイン含有タンパク質は、E 3 ユビキチン結合反応を媒体する (Aravind および Koonin、上掲)。E 3 ユビキチンリガーゼは、E 2 ユビキチンリガーゼから基質タンパク質へのユビキチンの移転に参画する。最近の刊行物は、一連の U ボックス含有タンパク質のユビキチンリガーゼ活性に関する強力な証拠を提供している (たとえば、Hatakeyama ら、2001, J. Biol. Chem., 276(35): 33111-33120; Murata ら、2001, EMBO, 21(121): 1133-1138; Meachem ら、2001, Nature Cell Biology, 3: 100-105; および Pringa ら、2001, J. Biol. Chem., 276(22): 19617-19623)。再構成アッセイ

30

【0086】

細胞中の多彩な重要な制御タンパク質がユビキチンの添加によって修飾される。ユビキチン化タンパク質のプロテオソーム分解は、細胞周期、分化、免疫応答および折り畳みを間違えたタンパク質のクリアランスなどの多くの細胞事象を制御している。R E T 1 6 は、その U ボックスドメインの観点から (U ボックスはユビキチン化、とりわけ E 3 ユビキチン結合反応を媒体するタンパク質の特徴である)、ユビキチンリガーゼとして特徴付けられる。

40

【0087】

E 3 ユビキチンリガーゼ活性を決定するため、Hatakeyama ら、2001 (上掲)、Murata ら、2001 (上掲) および Meachem ら、2001 (上掲) に記載のアッセイを行うことができる。ユビキチンリガーゼ活性に必要なユビキチンリガーゼタンパク質中のアミノ酸を同定するため、部位特異的突然変異誘発を用いることができる。さらに、U ボックスの全てまたは一部の欠失を行ってユビキチンリガーゼ活性を媒体するうえでの U ボックスの U ボックスの役割を確認することができる。欠失したまたは変異した U ボックスを含む R E T 1 6 をコ

50

ードするポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクションし、発現されたRET16タンパク質の細胞内での機能的役割を明らかにすることができる。この同じアプローチは、ユビキチンリガーゼの細胞での基質を単離および同定するうえでも利用できる。

【0088】

RET16ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

本発明は、RET16ポリペプチド（配列番号2または配列番号4）をコードするヒトRET16核酸配列（配列番号1または配列番号3）、および特にTNF-活性化内皮において一般に炎症プロセス、細胞活性化、または制御されない細胞増殖に参与する他の細胞シグナル伝達成分とのRET16の相互作用のアンタゴニストまたはインヒビターをスクリーニングする方法における、RET16ポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはその組成物の使用を包含する。

10

【0089】

本発明はさらに、本発明によるRET16核酸配列またはアミノ酸配列と少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%または99.9%同一である単離核酸またはポリペプチド分子を包含する。さらに詳細には、本発明は、配列番号12の配列と少なくとも82.0%同一であるヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、またはその断片；配列番号12の配列と少なくとも68.2%同一であるヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、またはその断片；および配列番号14の配列と少なくとも93.1%同一であるヌクレオチド配列を有する単離ポリヌクレオチド、またはその断片を包含する。さらに、本発明は、細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチドまたはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号13の配列と少なくとも82%の配列同一性を有するもの；および細胞シグナル伝達ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする単離ポリヌクレオチドまたはその断片であって、該ポリペプチドが配列番号15の配列と少なくとも95.0%の配列同一性を有するものを包含する。本発明はさらに、配列番号13に示す配列と少なくとも82%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する単離したおよび/または実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質；および配列番号15に示す配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する単離したおよび/または実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質を包含する。

20

30

【0090】

さらに本発明に包含されるのは、炎症および細胞炎症プロセスと関連する、または細胞増殖または細胞活性化プロセスと関連する障害または疾患の診断、治療または予防法における、RET16核酸配列およびRET16ポリペプチド、またはRET16核酸またはアミノ酸配の全てまたは部分と相互作用する分子の使用である。さらに、RET16遺伝子およびポリペプチドは、RET16と関連し、レセプター活性化、刺激、または制御されない細胞増殖によって駆動される炎症プロセスや細胞内シグナル伝達事象の発生に関与するマスタースイッチと関与しうるシグナル伝達カスケードのための重要なシグナルを提供する細胞シグナル伝達分子を決定するのに有用である。

40

【0091】

本発明に従い、ヒトRET16タンパク質をコードする核酸を、まずTNF-アルファ刺激したヒト肺微細血管内皮細胞からサブトラクションcDNAライブラリーで同定した。完全長のRET16遺伝子を、実施例1に記載するようにIncyteおよびパブリックESTデータベースから利用できるクローン配列を伸長することにより単離した。

【0092】

その1態様において、本発明は、図2および3に示す配列番号2のアミノ酸配列および図4Bに示す配列番号4のオープンリーディングフレームアミノ酸配列を含むポリペプチドを包含する。ヒトRET16ポリペプチドは長さが476アミノ酸である。図10A~図10Eは、RET16と他の幾つかのタンパク質、すなわちPodospira anserina植物不適

50

合 (vegetable incompatibility) タンパク質 H e t - E - 1 の部分 ; Thermomonospora c
urvata 推定セリン / トレオニンキナーゼ P W K A の部分 ; R E T 1 6 マウスオーソログ、
および部分 R E T 1 6 ラットオーソログとの構造上の類似性を描写するものである。

【 0 0 9 3 】

R E T 1 6 ポリペプチドの変異体もまた本発明により包含される。1つの側面では、R E
T 1 6 変異体は、本明細書に記載するアミノ酸配列 (配列番号 2 または配列番号 4) と少
なくとも 7 5 ~ 8 0 %、好ましくは少なくとも 8 5 ~ 9 0 %、さらに好ましくは少なくと
も 9 0 % のアミノ酸同一性を有し、これは R E T 1 6 ポリペプチドの少なくとも 1 の生物
学的、免疫学的、または他の機能的な特性または活性を保持している。最も好ましいのは
配列番号 2 または配列番号 4 に示すアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % のアミノ酸同一性を
有する変異体である。R E T 1 6 のアミノ酸配列は、以下の 3 つのうちの 1 またはそれ以
上に類別することができる : 置換変異体、挿入変異体、または欠失変異体。そのような変
異体は、典型的にカセットまたは P C R 突然変異誘発、または当業者によく知られた他の
方法を用い、R E T 1 6 タンパク質をコードする D N A においてヌクレオチドの部位特異
的突然変異誘発を行って変異体をコードする D N A を生成することによって調製する。そ
の後、この D N A を本明細書に記載するように組換え細胞培養液で発現させる。約 1 0 0
~ 1 5 0 残基までを有する変異体 R E T 1 6 タンパク質断片は、常法を用いてインビトロ
合成により調製できる。2 つの変異体 R E T 1 6 . 2 および R E T 1 6 . 3 を本明細書に記
載する [実施例 2 ; 図 1 6 (マルチプルシーケンシング) ; 図 1 8 (エクソ
ン構造) ; 図 1 9 A および 1 9 B (それぞれ変異体 R E T 1 6 . 2 のポリヌクレオチド配
列 (配列番号 1 2) およびアミノ酸配列 (配列番号 1 3)) ; および図 2 0 A および 2 0
B (それぞれ変異体 R E T 1 6 . 3 のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 4) およびアミ
ノ酸配列 (配列番号 1 5)) を参照 ;]。

10

20

【 0 0 9 4 】

アミノ酸配列変異体は、該変異体の前もって決定した性質、すなわち R E T 1 6 タンパク
質アミノ酸配列の天然のアレルまたは種間変異とは異なったものにする特性によって特徴
付けることができる。修飾した特性を有する変異体を選択することもできるけれども、変
異体は典型的に天然のアナログのものと同じ性質の生物学的活性を示す。アミノ酸配列の
変異を導入する部位または領域は前もって決定することができるが、変異自体は前もって
決定する必要がない。たとえば、所定の部位での変異の実行を最適にするため、標的コド
ンまたは領域でランダム突然変異誘発を行い、発現された R E T 1 6 変異体を所望の活性
の最適の組み合わせについてスクリーニングすることができる。既知の配列を有する D N
A 中の前もって決定した部位で置換変異を行う方法はよく知られており、たとえば M 1 3
プライマー突然変異誘発および P C R 突然変異誘発がある。変異体のスクリーニングは R
E T 1 6 タンパク質活性のアッセイを用いて行い、たとえば結合ドメインの変異については競合結合試験を行うことができる。

30

【 0 0 9 5 】

アミノ酸置換は典型的に単一の残基のものである ; 挿入は、通常 1 ~ 2 0 アミノ酸のオー
ダーであるが、相当長い挿入も許容しうる。欠失は約 1 ~ 約 2 0 残基の範囲であるが、幾
つかの場合には欠失は一層長いものであってもよい。

40

【 0 0 9 6 】

置換、欠失、挿入、またはそれらの組み合わせを用い、最終的な R E T 1 6 誘導体とする
ことができる。一般に、これら変化は、分子の変化を最小にするために幾つかのアミノ酸
にのみ影響を及ぼす。しかしながら、ある場合には一層長い変化も許容しうる。R E T 1
6 タンパク質の特性において小さな変化を望むか請け負う場合には、置換は一般に下記表
1 に従って行う。

【 0 0 9 7 】

表 1

【 表 1 】

| もとの残基 | 置換の例 |
|-------|---------------|
| Ala | Ser |
| Arg | Lys |
| Asn | Gln, His |
| Asp | Glu |
| Cys | Ser |
| Gln | Asn |
| Glu | Asp |
| Gly | Pro |
| His | Asn, Gln |
| Ile | Leu, Val |
| Leu | Ile, Val |
| Lys | Arg, Gln, Glu |
| Met | Leu, Ile |
| Phe | Met, Leu, Tyr |
| Ser | Thr |
| Thr | Ser |
| Trp | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe |
| Val | Ile, Leu |

10

20

【0098】

表1に示すものよりも保存的でない置換を選択することにより、機能または免疫学的な同一性において実質的な変化を生じさせる。たとえば、変化させる領域のポリヌクレオチド骨格の構造、たとえばアルファらせん、またはベータシート構造；標的部位の分子のヒドロフォビシティー；または側鎖の高張りに一層有意に影響を及ぼす置換を行うことができる。一般にポリペプチドの特性を最も大きく変化させると予測される置換は、(a)親水性残基、たとえばセリンまたはトレオニン疎水性残基、たとえばロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリンまたはアラニンで置換（またはこの逆）；(b)システインまたはプロリンを他の残基で置換（またはこの逆）；(c)正の荷電の側鎖を有する残基、たとえばリシン、アルギニンまたはヒスチジンを負の荷電の残基、たとえばグルタミン酸またはアスパラギン酸で置換（またはこの逆）；または(d)高張った側鎖を有する残基、たとえばフェニルアラニンを側鎖を有しない残基、たとえばグリシンで置換（またはこの逆）するものである。

30

【0099】

RET16変異体は通常は天然のアナログと同じ性質の生物学的活性または機能を示し、同じ免疫応答を誘起するが、必要に応じてRET16タンパク質の特性を修飾した変異体もまた選択できる。あるいは、変異体はRET16タンパク質の生物学的活性が変化するようにデザインすることができる。

40

【0100】

他の態様において、本発明はRET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを包含する。従って、RET16ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を用いてRET16タンパク質を発現する組換え分子を製造することができる。特別の態様において、本発明は、図1および図4Aにそれぞれ示す配列番号1および配列番号3の核酸配列を含むRET16ポリヌクレオチド、および配列番号6の核酸配列を含むヒトRET16のマウスオーソログ；並びに配列番号8の核酸配列を含むヒトRET16のラットオーソログを包含する。さらに詳細には、本発明は、ブダペスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC；10801ユニバーシティー・プール、マナサス、バージニア20110-2209)にATCC受託番号PTA-31

50

61にて2001年3月7日に寄託してある、クローニング完全長オープンリーディングフレームのヒトRET16 cDNA(1532bp; RET16.1ともいう)を提供する。

【0101】

好ましい態様において、本発明は、その結果得られたRET16.1のコードされたポリペプチドに加えて、最初の開始コドンを除くポリヌクレオチドを包含する。とりわけ、本発明は、配列番号1のヌクレオチド151~1575に対応するポリヌクレオチド、および配列番号2のアミノ酸2~476に対応するポリペプチドを包含する。また、本明細書に記載するように、RET16.1コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞も包含される。

10

【0102】

他の好ましい態様において、本発明は、その結果得られたRET16.2のコードされたポリペプチドに加えて、最初の開始コドンを除くポリヌクレオチドを包含する。とりわけ、本発明は、配列番号12のヌクレオチド114~1262に対応するポリヌクレオチド、および配列番号13のアミノ酸2~384に対応するポリペプチドを包含する。また、本明細書に記載するように、RET16.2コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞も包含される。

【0103】

他の好ましい態様において、本発明は、その結果得られたRET16.3のコードされたポリペプチドに加えて、最初の開始コドンを除くポリヌクレオチドを包含する。とりわけ、本発明は、配列番号14のヌクレオチド139~1641に対応するポリヌクレオチド、および配列番号15のアミノ酸2~502に対応するポリペプチドを包含する。また、本明細書に記載するように、RET16.3コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞も包含される。

20

【0104】

他の好ましい態様において、本発明は、その結果得られたマウスRET16のコードされたポリペプチドに加えて、最初の開始コドンを除くポリヌクレオチドを包含する。とりわけ、本発明は、配列番号6のヌクレオチド19~1443に対応するポリヌクレオチド、および配列番号7のアミノ酸2~475に対応するポリペプチドを包含する。また、本明細書に記載するように、マウスRET16コード配列を含む組換えベクター、および該ベクターを含む宿主細胞も包含される。

30

【0105】

当該技術分野における熟練した実施者には評価されるであろうように、遺伝暗号の縮重は本発明のRET16ポリペプチドをコードする多数のヌクレオチド配列を生じる結果となる。これらの配列の幾つかは、既知のおよび天然の遺伝子のヌクレオチド配列とは最小のホモロジーしか有しない。従って、本発明は、可能なコドン選択に基づいた組み合わせを選択することにより作製できるヌクレオチド配列の可能な全ての変化物を包含する。これら組み合わせは、天然のRET16のヌクレオチド配列に適用されるように標準トリプレット遺伝コードに従って作製し、そのような全ての変化物は個別に開示されるものと考えなければならない。

40

【0106】

RET16ポリペプチドおよびその変異体をコードするヌクレオチド配列は、適当に選択したストリンジェンシーの条件下で天然のRET16ポリペプチドのヌクレオチド配列にハイブリダイズできるのが好ましいが、RET16ポリペプチドまたはその誘導体をコードするが実質的に異なるコドン使用頻度のヌクレオチド配列を製造するのが有利である。コドンの選択は、特定の原核または真核宿主細胞において、該宿主細胞、たとえば植物細胞または酵母細胞または両生類細胞によって利用される特定コドンの使用頻度に従い、ペプチド/ポリペプチドの発現速度を増大させるように行うことができる。コードされるアミノ酸配列を変えずにRET16ポリペプチドおよ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える他の理由としては、天然の配列から生成する転写物に比べ

50

てより望ましい特性、たとえばより長い半減期を有する mRNA 転写物を産生することが挙げられる。

【0107】

本発明はまた、RET16ポリペプチドおよびその誘導体をコードするDNA配列またはその部分を完全に合成化学により製造することを包含する。製造後、合成した配列を当業者によく知られ実施されている試薬を用いて多くの利用できる発現ベクターおよび細胞系のいずれにも挿入することができる。さらに、合成化学を用いてRET16ポリペプチドまたはその断片をコードする配列に変異を導入することができる。

【0108】

また、本発明により包含されるのは、配列番号1または配列番号3に示すものなどのRET16の特許請求したヌクレオチド配列に様々なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズすることのできるポリヌクレオチド配列である。ハイブリダイゼーション条件は典型的に核酸結合複合体またはプローブの融解温度(T_m)に基づくものであり(G. M. WahlおよびS. L. Berger, 1987; Methods Enzymol., 152: 399-407およびA. R. Kimmel, 1987; Methods of Enzymol., 152: 507-511を参照)、定めたストリンジェンシーにて用いることができる。たとえば、本発明に包含されるのは、配列番号1または配列番号3のRET16核酸配列およびRET16ポリペプチドをコードする配列の縮重である他の配列に中くらいのストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることのできる配列、である(たとえば、制限されない例として、 $2 \times S S C$ 、 $0.5\% S D S$ 、 $1.0 m M E D T A$ 、 $p H 8.0$ のプレ洗浄溶液、および 50 のハイブリダイゼーション条件、 $5 \times S S C$ 、一夜)。

【0109】

本発明の他の態様において、RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片(ペプチド)は、適当な宿主細胞中でRET16ポリペプチドまたはその断片またはその機能的等価物の発現を指令する組換えDNA分子に用いることができる。遺伝コードがもともと縮重しているため、実質的に同じかまたは機能的に同等のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を製造することができ、これら配列もRET16タンパク質を発現させるのに用いることができる。

【0110】

当業者により評価されるであろうように、天然に存在しないコドンをもつRET16ポリペプチドコードヌクレオチド配列を製造することは有利である。たとえば、特定の原核または真核宿主細胞に好まれるコドンを選択し、タンパク質の発現速度を増大させたり、または所望の特性、たとえば天然の配列から生成する転写物よりも長い半減期を有する組換えRNA転写物を製造することができる。

【0111】

本発明のヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現を修飾する改変(これらに限られるものではない)を含む様々な理由からRET16ポリペプチドコード配列を変化させるため、当該技術分野で一般に知られた方法を用いて遺伝子操作することができる。ランダムフラグメント形成(fragmentation)および遺伝子断片と合成オリゴヌクレオチドとのPCR再アセンブリーによるDNAシャフリングを用いてヌクレオチド配列を遺伝子操作することができる。たとえば、部位特異的突然変異誘発を用いて、新たな制限部位の挿入、グリコシル化パターンの変更、コドンの優先性の変化、スプライス変異体の作製、または変異の導入などを行うことができる。

【0112】

本発明の他の態様において、RET16ポリペプチドをコードする天然の、修飾した、または組換えの核酸配列またはその断片を、融合タンパク質をコードする異種配列にライゲートすることができる。たとえば、RET16活性または結合のインヒビターまたはモデュレーターをペプチドライブラリーでスクリーニングするには、市販の抗体により認識できるキメラRET16タンパク質をコードするのが有用である。融合タンパク質はまた、RET16タンパク質を異種残基部分から開裂および精製できるようにRET16タンパ

ク質コード配列と異種タンパク質配列との間に開裂部位を含むように遺伝子操作することができる。

【0113】

従って、本発明は、細胞シグナル伝達カスケードに関与し、配列番号1、3、5、6、8、12または14に示す核酸配列または遺伝子コードの重複の結果、配列番号1、3、5、6、8、12または14の配列の縮重核酸配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる実質的に精製した細胞シグナル伝達タンパク質を包含する。そのような融合タンパク質はさらに、配列番号2、4、7、9、13または15のアミノ酸配列の全てまたは部分、または配列番号2、4、7、9、13または15に示す配列と少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、および第二のタンパク質のアミノ酸配列を含んでいてよい。

10

【0114】

他の態様において、RET16産物の機能を妨害するインヒビター化合物、またはRET16産物の機能を刺激するアクチベーター化合物を同定するのに、リガンド結合アッセイが有用である。そのようなアッセイは、タンパク質の機能が不明であっても有用である。これらアッセイは、特定の標的分子、たとえばタンパク質やペプチドへの被験化合物の結合を検出すべくデザインする。検出には結合を直接測定することが含まれる。あるいは、結合の間接的な表示として、タンパク質構造の安定化、または生物学的機能の妨害または促進が含まれる。有用なリガンド結合アッセイの制限されない例を以下に詳記する。

【0115】

結合タンパク質の検出および単離に有用な1つの方法は、Pharmacia Biosensorによって開発され、製造業社のプロトコール(LKB Pharmacia, スウェーデン)に記載されているBiomolecular Interaction Assay (BIAcore) システムである。BIAcoreシステムは、アフィニティー精製した抗GST抗体を用いてGST-融合タンパク質をセンサーチップに固定化する。このセンサーは、屈折率の変化を検出する最適の現象である表面プラズモン共鳴を利用している。従って、目的とするタンパク質、たとえば本発明のRET16ポリペプチドまたはその断片をチップ上に固定化し、被験化合物をチップに通す。結合は屈折率の変化(表面プラズモン共鳴)により検出する。

20

【0116】

異なるタイプのリガンド結合アッセイは、米国特許第4,568,649号に記載されているようにシンチレーション近似アッセイ(scintillation proximity assays; SPA)を含む。現在開発中のこのアッセイの変法では、シャペロニン(chaperonin)を用いて折り畳まれたタンパク質と折り畳まれていないタンパク質とを識別する。標識したタンパク質をSPAビーズに付着させ、被験化合物を加える。ついで、ビーズを穏やかな変性条件、たとえば熱、SDSへの暴露などに供し、精製した標識シャペロニンを加える。もしも被験化合物が標的タンパク質に結合しておれば標識シャペロニンは結合しないであろう;逆に被験化合物が結合していなければ、該タンパク質はいくらかの変性を受け、シャペロニンは結合するであろう。他のタイプのリガンド結合アッセイでは、ミトコンドリアターゲティングシグナルを含むタンパク質を単離したミトコンドリアにインビトロで移入させる(Hurtら、1985、EMBO J., 4: 2061-2068; EilersおよびSchatz, 1986、Nature, 322: 228-231)。ミトコンドリア移入アッセイでは、特定の標的タンパク質をコードする核酸をミトコンドリア移入シグナルをコードする配列の下流に挿入した発現ベクターを構築する。キメラタンパク質を合成し、該キメラタンパク質が被験化合物の不在下および存在下で単離ミトコンドリア中に移送されることができると否かについて試験する。標的タンパク質に結合する被験化合物は、それが単離ミトコンドリア中にインビトロで取り込まれるのを抑制するに違いない。

30

40

【0117】

本発明に従って用いるのに適した他のタイプのリガンド結合アッセイは、酵母2ハイブリッド系である(FieldsおよびSong, 1989、Nature, 340: 245-246)。酵母2ハイブリッド系は、酵母*S. cerevisiae*のGAL4タンパク質の特性を利用している。GAL4タンパ

50

ク質は、ガラクトースの利用に關与する酵素をコードする遺伝子の発現に必要な転写アクチベーターである。GAL4タンパク質は、2つの分離できる機能的に必須のドメインからなっている：すなわち、特定のDNA配列(UASG)に結合するN末端ドメイン；および酸性領域を含むC末端ドメイン(転写を活性化するのに必要である)。両ドメインを含む天然のGAL4タンパク質は、酵母菌体がガラクトース培地で増殖するときに転写の強力なアクチベーターである。N末端ドメインはDNAに配列特異的に結合するが、転写を活性化することはできない。C末端ドメインは活性化領域を含むが、UASGに配置できないので転写を活性化することができない。2ハイブリッド系では、2つのハイブリッドタンパク質の系がGAL4の部分を含む：(1)タンパク質「X」に融合したGAL4 DNA結合ドメイン；および(2)タンパク質「Y」に融合したGAL4活性化領域。タンパク質XとYとがタンパク質-タンパク質複合体を形成し、GAL4ドメインの近接性を再構築できれば、UASGによって制御される遺伝子の転写が起こる。それぞれ相互作用タンパク質XおよびYを含む2つのハイブリッドタンパク質の生成が、UASGの活性化領域をその通常の作用部位にもってくることを可能にする。

10

【0118】

Fodorら、1991、Science、251: 767-773に記載された結合アッセイもまた有用であり、これは固相基体上に合成した複数の所定のポリマーに対する被験化合物の結合親和性を試験することを含む。本発明によるRET16ポリペプチドまたはその部分に結合する化合物は、治療用組成物に使用するための薬剤として有用な可能性がある。

【0119】

他の態様において、RET16ポリペプチドをコードする配列は、その全体または一部を当該技術分野でよく知られた化学的方法を用いて合成することができる(たとえば、M. H. Caruthersら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 215-223およびT. Horn, Tら、1980、Nucl. Acids Res. Symp. Ser., 225-232を参照)。別法として、タンパク質自体を化学的方法を用いて製造してRET16ポリペプチドまたはその断片または部分のアミノ酸配列を合成することができる。たとえば、ペプチド合成は種々の固相法(J. Y. Robergeら、1995、Science、269: 202-204)を用いて行うことができ、たとえばABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems)を用いて自動合成を達成することができる。

20

【0120】

新たに合成したペプチドは、分取高速液体クロマトグラフィー(たとえば、T. Creighton、1983、Proteins, Structures and Molecular Principles、WH Freeman and Co.、ニューヨーク、ニューヨーク)により、逆相高速液体クロマトグラフィーにより、または当該技術分野でよく知られた他の精製法により実質的に精製することができる。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り確認することができる(たとえば、エドマン分解法；Creighton、上掲)。さらに、RET16ポリペプチドまたはその部分のアミノ酸配列は、直接合成の際におよび/または化学合成法を他のタンパク質からの配列またはその部分と組み合わせることで変化させて変異体ポリペプチドを製造することができる。

30

【0121】

ヒトRET16タンパク質の発現

生物学的に活性な/機能性のRET16ポリペプチドまたはペプチドを発現するため、RET16ポリペプチドまたは機能的等価物をコードするヌクレオチド配列を適当な発現ベクター、たとえば挿入したコード配列の転写および翻訳に必要な配列を含むベクターに挿入することができる。RET16ポリペプチドをコードする配列および適当な転写および翻訳調節配列を含む発現ベクターを構築するため、当業者によく知られ実施されている方法を用いることができる。これら方法としては、インビトロ組換えDNA法、合成法、およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。そのような方法は、J. Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、プレインビュー、ニューヨークおよびF. M. Ausubelら、1989、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク、ニューヨークに記載されている。

40

50

【0122】

様々な発現ベクター/宿主系を利用してRET16ポリペプチドをコードする配列を含ませ発現させることができる。そのような発現ベクター/宿主系としては、これらに限られるものではないが、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した細菌などの微生物；酵母または真菌発現ベクターで形質転換した酵母または真菌；ウイルス発現ベクター（たとえば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；ウイルス発現ベクター（たとえば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）およびタバコモザイクウイルス（TMV））または細菌発現ベクター（たとえば、TiまたはpBR322プラスミド）で形質転換した植物細胞系；または動物細胞系が挙げられる。使用した宿主細胞は本発明を限定するものではない。

10

【0123】

「調節配列」または「制御配列」とは、ベクターの非翻訳領域、たとえばエンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域（宿主細胞のタンパク質と相互作用して転写および翻訳を行う）である。そのような配列は、その強度および特異性において様々であってよい。使用するベクター系および宿主に応じて、適当な転写および翻訳配列（構成的および誘導性プロモーターを含む）を幾つ用いてもよい。たとえば、細菌系にクローニングする場合は、BLUESCRIPTファージミド（Stratagene、ラジヨラ、カリフォルニア）またはSPORT1プラスミド（Life Technologies）のハイブリッドlacZプロモーターなどを使用できる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に用いることができる。植物細胞のゲノムに由来する（たとえば、熱ショック、RUBISCO；および貯蔵タンパク質遺伝子）または植物ウイルスに由来する（たとえば、ウイルスプロモーターまたはリーダー配列）プロモーターまたはエンハンサーをベクターにクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子に由来するまたは哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターが好ましい。RET16をコードする配列の複数のコピーを含む細胞株を生成する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーとともに用いることができる。

20

【0124】

細菌系では、発現されたRET16産物に使用する意図に応じて多くの発現ベクターを選択することができる。たとえば、抗体を誘起するために多量の発現タンパク質を必要とする場合は、融合タンパク質の高レベルの発現を指令し、該融合タンパク質を容易に精製できるベクターを用いることができる。そのようなベクターとしては、これらに限られるものではないが、BLUESCRIPT（Stratagene）（RET16ポリペプチドまたはそのペプチドをコードする配列をアミノ末端Metおよびそれに続く - ガラクトシダーゼの7残基の配列とインフレームでライゲートし、ハイブリッドタンパク質が産生されるようにすることができる）；pINベクター（たとえば、G. Van HeekeおよびS. M. Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 264: 5503-5509を参照）などの多機能大腸菌クローニングおよび発現ベクターが挙げられる。pGEXベクター（Promega、マジソン、ウイスコンシン）もまたグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現するのに用いることができる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させた後に遊離のグルタチオンの存在下で溶出することにより溶解細胞から容易に精製することができる。そのような系で製造したタンパク質は、目的とするクローニングポリペプチドを所望によりGST残基から放出できるように、ヘパリン、トロンピン、または第XA因子プロテアーゼ開裂部位を含むようにデザインすることができる。

30

40

【0125】

酵母*Saccharomyces cerevisiae*では、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHなどの構成的および誘導性のプロモーターを含む多くのベクターを用いることができる（概説として、F. M. Ausubelら、上掲、およびGrantら、1987, Methods Enzymol., 153: 516-544を参照）。

【0126】

50

植物発現ベクターが望ましく、使用する場合には、RET16ポリペプチドをコードする配列の発現は多くのプロモーターのいずれによっても駆動することができる。たとえば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを単独またはTMVからのオメガリーダー配列と組み合わせて用いることができる(N. Takamatsu, 1987, EMBO J., 6: 307-311)。あるいは、RUBISCOの小サブユニット、または熱ショックプロモーターなどの植物プロモーターを用いることができる(G. Coruzziら、1984, EMBO J., 3: 1671-1680; R. Broglieら、1984, Science, 224: 838-843; およびJ. Winterら、1991, Results Probl. Cell Differ. 17:85-105)。これら構築物は、直接DNA形質転換または病原体媒体トランスフェクションにより植物細胞に導入することができる。そのような方法は、多くの一般に利用できる概説に記載されている(たとえば、S. HobbesまたはL. E. Murry, In: McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, ニューヨーク、ニューヨーク、pp. 191-196を参照)。

10

【0127】

昆虫系を用いてRET16ポリペプチドを発現することもできる。たとえば、そのような1つの系として、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACNPV)をSpodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeで外来遺伝子を発現するためのベクターとして用いる。RET16ポリペプチドをコードする配列をポリヘドリン遺伝子などの該ウイルスの非必須領域中にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置くことができる。RET16ポリペプチドがうまく挿入しておればポリヘドリン遺伝子は不活化され、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生される。ついで、組換えウイルスを用いてたとえばS. frugiperda細胞またはTrichoplusia larvaeを感染させることができ、この中でRET16ポリペプチドを発現させることができる(E. K. Engelhardら、1994, Proc. Nat. Acad. Sci., 91: 3224-3227)。

20

【0128】

哺乳動物宿主細胞では多くのウイルスベースの発現系を用いることができる。アデノウイルスを発現ベクターとして用いる場合は、RET16ポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーターおよび3連のリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体にライゲートすることができる。感染した宿主細胞でRET16ポリペプチドを発現できる生きたウイルスを得るため、ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域を用いることができる(J. LoganおよびT. Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 3655-3659)。さらに、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーなどの転写エンハンサーを用いて哺乳動物宿主細胞での発現を増大させることができる。

30

【0129】

特定の開始シグナルを用いてRET16ポリペプチドをコードする配列の一層効率的な翻訳を達成することもできる。そのようなシグナルとしては、ATG開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。RET16ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を適当な発現ベクターに挿入する場合には、さらに転写または翻訳調節シグナルは必要ない。しかしながら、コード配列またはその断片のみを挿入する場合には、外来の翻訳調節シグナル(ATG開始コドンを含む)を提供しなければならない。さらに、全挿入物の翻訳を確実にするため、開始コドンは正しい読取り枠になければならない。異種翻訳配列および開始コドンは、天然および合成の両者とも様々な起源のものであってよい。発現の効率は、文献記載のもののような(D. Scharfら、1994, Results Probl. Cell Differ., 20: 125-162)、使用した特定の細胞系に適したエンハンサーを含めることによって促進することができる。

40

【0130】

さらに、宿主細胞株は、挿入配列の発現を変調したり発現タンパク質を所望の仕方でプロセッシングする能力について選択することができる。そのようなポリペプチドの修飾としては、これらに限られるものではないが、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(lipidation)、およびアシル化が挙げられる。タンパク質の「プレプロ」形を開裂する翻訳後プロセッシングもまた、正しい挿入、折り畳みおよび/または機能を

50

容易にするために用いることができる。そのような翻訳後活性のための特別の細胞機構および特徴的なメカニズムを有する種々の宿主細胞（たとえば、C O S、C H O、H e L a、M D C K、H E K 2 9 3、およびW 1 3 8）が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（A T C C；1 0 8 0 1 ユニバーシティ・プール、マナサス、バージニア2 0 1 1 0 - 2 2 0 9）から利用でき、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確実にすべく選択することができる。

【0 1 3 1】

組換えタンパク質の長期にわたる高収率の産生のためには安定した発現が好ましい。たとえば、R E T 1 6 タンパク質を安定に発現する細胞株を、ウイルスの複製起点および/または内生の発現配列および選択マーカー遺伝子と同じかまたは別個のベクター上に含む発現ベクターを用いて形質転換することができる。ベクターを導入後、選択培地に切り換える前に細胞を富んだ細胞培養培地で1~2日間増殖させることができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在が導入配列を首尾よく発現している細胞の増殖および回収を可能とする。安定に形質転換した細胞の耐性クローンは、その細胞のタイプに適した組織培養法を用いて増殖させることができる。

10

【0 1 3 2】

形質転換した細胞株を回収するため、幾つの選択系も用いることができる。これらとしては、これらに限られるものではないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（H S V T K）（M. Wiglerら、1977, Cell, 11: 223-32）およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（I. Lowyら、1980, Cell, 22: 817-23）遺伝子が挙げられ、これらはそれぞれ t k⁻細胞または a p r t⁻細胞で用いることができる。また、代謝拮抗物質、抗生物質または除草剤耐性を選択の基礎として用いることができる；たとえば、メトトレキサートに対する耐性を付与する d h f r（M. Wiglerら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci., 77: 3567-70）；アミノグリコシドのネオマイシンおよび G - 4 1 8 に対する耐性を付与する n p t（F. Colbere-Garapinら、1981, J. Mol. Biol., 150: 1-14）；およびそれぞれクロルスルホンおよび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付与する a l s または p a t（Murry、上掲）。さらなる選択遺伝子が記載されている、たとえば、トリプトファンの代わりにインドールを細胞に利用させる t r p B、またはヒスチジンの代わりにヒスチノールを細胞に利用させる h i s D（S. C. Hartmanおよび R. C. Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 8047-51）。最近、アントシアニン、

20

30

【0 1 3 3】

マーカー遺伝子発現の存在/不在は目的遺伝子が存在することをも示唆するものであるが、目的とする所望の遺伝子の存在および発現は確認する必要がある。たとえば、R E T 1 6 核酸配列ポリペプチドがマーカー遺伝子配列内に挿入されていると、R E T 1 6 ポリペプチドをコードする配列を含む組換え細胞はマーカー遺伝子機能の不在によって同定できる。あるいは、マーカー遺伝子は R E T 1 6 ポリペプチドをコードする配列とタンデムに単一のプロモーターの制御下に配置することができる。誘発または選択に応答したマーカー遺伝子の発現は、通常、タンデム遺伝子の同時発現を示す。

40

【0 1 3 4】

あるいは、R E T 1 6 ポリペプチドをコードする核酸配列を含み、R E T 1 6 ポリペプチド産物を発現する宿主細胞は、当業者に知られた様々な方法により同定することができる。これら方法としては、これらに限られるものではないが、核酸またはタンパク質の検出および/または定量のための、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションおよびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ法（メンブレン、溶液、またはチップベースの方法を含む）が挙げられる。

50

【0135】

好ましくは、RET16ポリペプチドは発現後に実質的に精製する。RET16タンパク質は、試料中に他のどのような成分が存在しているかにより、当業者に知られ実施されている様々な仕方で単離または精製することができる。標準的な精製法としては、電気泳動法、分子生物学的方法、免疫学的方法およびクロマトグラフィー法（イオン交換クロマトグラフィー、疎水性アフィニティークロマトグラフィーおよび逆相HPLCクロマトグラフィーを含むが、これらに限られるものではない）が挙げられる。たとえば、RET16タンパク質は、標準的な抗RET16抗体カラムを用いて精製することができる。タンパク質濃度と組み合わせた限外濾過およびダイアフィルトレーション法を用いることもできる。適当な精製法の一般的な手引きとしては、R. Scopes, 1982, Protein Purification, Springer-Verlag, ニューヨークを参照。熟練した実施者には理解されるであろうように、必要な精製の程度はRET16タンパク質の使用目的により変わりうる；場合によっては精製が必要ないこともあるであろう。

【0136】

組換え製造に加え、RET16ポリペプチドの断片は固相法を用いた直接ペプチド合成により製造できる（J. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154）。タンパク質合成は、手動法を用いるかまたは自動化により行うことができる。自動合成は、たとえば、ABI 431A Peptide Synthesizer（PE Biosystems）を用いて達成することができる。RET16の様々な断片を別々に化学合成し、ついで化学法を用いて組み合わせることにより完全長の分子を生成することができる。

【0137】

ヒトRET16ポリヌクレオチドの検出

RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の存在は、DNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションにより、またはRET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのプロブまたは部分または断片を用いた増幅により検出することができる。核酸増幅ベースのアッセイは、RET16ポリペプチドをコードする配列に基づいたオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーを使用することにより、RET16ポリペプチドをコードするDNAまたはRNAを含む形質転換体を検出することを含む。

【0138】

広範な様々な標識およびコンジュゲート法が当業者に知られ、用いられており、様々な核酸およびアミノ酸アッセイに用いることができる。RET16ポリペプチド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ハイブリダイゼーションまたはPCRプロブを生成する手段としては、オリゴ-標識、ニックトランスレーション、末端標識、または標識ヌクレオチドを用いたPCR増幅が挙げられる。あるいは、RET16ポリペプチドまたはその部分または断片をコードする配列を、mRNAプロブの産生のためのベクター中にクローニングすることができる。そのようなベクターは当該技術分野で知られ市販されており、T7、T3、またはSP(6)および標識ヌクレオチドなどの適当なRNAポリメラーゼを加えることによりインビトロでRNAプロブを合成するのに用いることができる。これら方法は、様々な市販のキット（たとえば、Amersham Pharmacia Biotech, PromegaおよびU. S. Biochemical Corp.）を用いて行うことができる。使用できる適当なリポーター分子または標識としては、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学ルミネセンス剤、または色原体、並びに基質、補因子、インヒビター、マグネチック粒子などが挙げられる。

【0139】

ヒトRET16ポリペプチド - 産生、検出、単離

RET16タンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはその断片で形質転換した宿主細胞は、該タンパク質の細胞培養からの発現および回収に適した条件下で培養することができる。組換え細胞によって産生されたタンパク質は、使用した配列および/またはベクターに依存して分泌されるかまたは細胞内に含まれている。当業者には理解されるであろうように、RET16タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは

、原核または真核細胞膜を通した R E T 1 6 タンパク質の分泌を指令するシグナル配列を含むようにデザインすることができる。

【 0 1 4 0 】

R E T 1 6 タンパク質をコードする核酸配列を可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードするヌクレオチド配列に結合させるため、他の構築を用いることができる。そのような精製を容易にするドメインとしては、これらに限られるものではないが、固定化した金属上での精製を可能にするヒスチジン - トリプトファンモジュールなどの金属キレート形成ペプチド；固定化した免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテイン A ドメイン；および F L A G S 伸長 / アフィニティー精製系 (Immunex Corp.、シアトル、ワシントン) で利用されるドメインが挙げられる。精製ドメインと R E T 1 6 タンパク質との間に第 X A 因子やエンテロキナーゼに特異的なもの (Invitrogen、サンジエゴ、カリフォルニア) などの開裂可能なリンカー配列を含めることを精製を容易にするために用いることができる。1つのそのような発現ベクターは、R E T 1 6 コード配列とチオレドキシニンに先行する 6 ヒスチジン残基またはエンテロキナーゼ開裂部位をコードする核酸とを含む融合タンパク質の発現を提供する。ヒスチジン残基は、J. Porathら、1992, *Prot. Exp. Purif.*, 3: 263-281に記載されているように I M A C (固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) での精製を容易にし、一方、エンテロキナーゼ開裂部位は融合タンパク質からの精製手段を提供する。融合タンパク質の産生に適したベクターの論考については、D. J. Krollら、1993, *DNA Cell Biol.*, 12: 441-453を参照。

10

【 0 1 4 1 】

プラスミドベクターに含まれ発現されるものよりも大きな D N A 断片を送達するため、ヒト人工染色体 (H A C) を用いることができる。H A C は、サイズが 1 0 K ~ 1 0 M の D N A 配列を含むことができ、安定な有糸分裂による染色体分離および保持に必要な全ての配列を含む線状の微小染色体である (J. J. Harringtonら、1997, *Nature Genet.*, 15: 345-355を参照) 。 6 ~ 1 0 M の H A C を構築し、治療目的のために通常の送達手段 (たとえば、リボソーム、ポリカチオン性アミノポリマー、またはベシクル) により送達する。

20

【 0 1 4 2 】

タンパク質に特異的なポリクローナル抗体かまたはモノクローナル抗体のいずれかを用いて R E T 1 6 ポリペプチドの発現を検出および測定するための様々なプロトコールが当該技術分野で知られ、実施されている。例としては、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ (E L I S A) 、ラジオイムノアッセイ (R I A) 、および蛍光活性化セルソーティング (F A C S) が挙げられる。R E T 1 6 ポリペプチド上の 2 つの相互に妨害しないエピトープと反応性のモノクローナル抗体を用いた 2 部位モノクローナル抗体ベースイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイを用いることもできる。これらおよび他のアッセイは、R. Hamptonら、1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press、セントポール、ミネソタおよび D. E. Maddoxら、1983; *J. Exp. Med.*, 158: 1211-1216の刊行を代表として当該技術分野に記載されている。

30

【 0 1 4 3 】

抗ヒト R E T 1 6 抗体およびその使用

精製した R E T 1 6 タンパク質またはその断片は、抗体を産生するため、または医薬または他の化合物、とりわけ小さな分子のライブラリーをスクリーニングして R E T 1 6 に特異的に結合するものを同定するのに用いることができる。そのような抗体は本発明の R E T 1 6 ポリペプチドのアンタゴニストまたはインヒビターとして有用であり、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または組換えにより製造したものであってよい。

40

【 0 1 4 4 】

R E T 1 6 ポリペプチドまたはその免疫原性のペプチド断片に特異的な抗体は、当該技術分野で長く知られ通常用いられている方法を用いて製造することができる。そのような抗体としては、これらに限られるものではないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、F a b フラグメント、および F a b 発現ライブラリーによって製造されるフラグメントが挙げられる。中和抗体 (すなわち、二量体形成を抑制する

50

抗体)は治療用に使用するのに特に好ましい。

【0145】

抗体を産生するには、種々の宿主(ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ラット、マウス、ヒトその他を含む)をRET16ポリペプチドまたは免疫原性の特性を有するそのペプチド断片またはオリゴペプチドを注射して免疫することができる。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができる。適当なアジュバントの制限されない例としては、フロイントの(不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムやシリカなどの金属ゲル、および表面活性物質、たとえばリソレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、KLH、およびジニトロフェノールが挙げられる。ヒトに典型的に使用するアジュバントとしては、BCG(bacilli Calmette Guerin)およびCorynebacterium parvumが挙げられる。 10

【0146】

好ましくは、RET16ポリペプチドに対する抗体を誘発するのに使用するペプチド、断片またはオリゴペプチド(すなわち、免疫原)は、少なくとも5つのアミノ酸、より好ましくは少なくとも7~10のアミノ酸を有するアミノ酸配列を有する。また、免疫原は天然のタンパク質のアミノ酸配列の部分と同一であるのが好ましい;免疫原はまた、小さな天然分子の全アミノ酸配列を含んでいてよい。ペプチド、断片またはオリゴペプチドは、単一のエピトープまたは抗原決定基または複数のエピトープを含んでいてよい。RET16アミノ酸の短いストレッチを他のタンパク質のアミノ酸(たとえば、KLH)と融合させ、このキメラ分子に対して抗体を産生させる。 20

【0147】

RET16ポリペプチドまたはその免疫原性の断片に対するモノクローナル抗体は、培養中の連続的な細胞株による抗体分子の産生を提供するあらゆる方法を用いて製造することができる。これら方法としては、これらに限られるものではないが、ハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法、およびEBV-ハイブリドーマ法が挙げられる(G. Kohlerら、1975, Nature, 256: 495-497; D. Kozborら、1985, J. Immunol. Methods, 81: 31-42; R. J. Coteら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030; およびS. P. Coleら、1984, Mol. Cell Biol., 62: 109-120)。モノクローナル抗体の産生は当該技術分野でよく知られており、日常的に用いられている。 30

【0148】

さらに、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術である、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライスして適当な抗原特異性と生物学的活性とを備えた分子を得ることを用いることができる(S. L. Morrisonら、1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855; M. S. Neubergerら、1984, Nature, 312: 604-608; およびS. Takedaら、1985, Nature, 314: 452-454)。あるいは、当該技術分野で知られた方法を用いて一本鎖抗体を産生するために記載された技術を採用し、RET16ポリペプチドに特異的な一本鎖抗体を生成することができる。関連した特異性を有するが異なるイデオタイプ組成の抗体は、ランダムコンビネーション免疫グロブリンライブラリーからの鎖シャフリングにより生成することができる(D. R. Burtonら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 11120-3)。抗体はまた、文献に開示されているように(R. Orlandiら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3833-3837およびG. Winterら、1991, Nature, 349: 293-299)、リンパ球集団におけるインビボ産生で誘発することにより、または組換え免疫グロブリンライブラリーもしくは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによっても産生することができる。 40

【0149】

RET16ポリペプチドに特異的な結合部位を含む抗体フラグメントを生成することもできる。たとえば、そのようなフラグメントとしては、これらに限られるものではないが、抗体分子のペプシン消化によって生成することのできるF(ab')₂フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋の還元によって生成することのできるFabフラグメントが挙げられる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特 50

異性を有するモノクローナル F a b フラグメントの迅速かつ容易な同定を可能とすることができる (W. D. Huseら、1989, Science, 254, 1275-1281)。

【0150】

所望の特異性を有する抗体を同定するため、様々なイムノアッセイを用いてスクリーニングすることができる。確立した特異性を有するポリクローナル抗体かまたはモノクローナル抗体を用いた競合結合または免疫放射測定アッセイのための多数のプロトコールが当該技術分野でよく知られている。そのようなイムノアッセイは、典型的に R E T 1 6 ポリペプチドとその特異的な抗体との間での複合体の生成を測定することを含む。2つの相互に妨害しない R E T 1 6 ポリペプチドエピトープと反応性のモノクローナル抗体を用いた2部位モノクローナル抗体ベースイムノアッセイが好ましいが、競合結合アッセイを用いることもできる (Maddox、上掲)。

10

【0151】

治療剤 / 処置

本発明の1つの態様において、R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片または相補鎖は治療目的に用いることができる。1つの側面において、R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対するアンチセンスは、R E T 1 6 m R N A の転写を妨害することが望ましい状況で用いることができる。とりわけ、本明細書の実施例4に記載するように、R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的な配列で細胞を形質転換またはトランスフェクションすることができる。かくして、相補的な分子を用いてヒト R E T 1 6 ポリヌクレオチドおよびポリペプチド活性を変調し、または遺伝子機能の制御を達成することができる。そのような技術は今や当該技術分野でよく知られており、R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のコード領域または非コード領域の種々の位置からセンスまたはアンチセンスのオリゴマーまたはオリゴヌクレオチドまたは一層大きな断片をデザインすることができる。

20

【0152】

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、または他の様々な細菌プラスミド由来の発現ベクターを、ヌクレオチド配列を標的生物、組織または細胞集団に送達するのに用いることができる。R E T 1 6 ポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な核酸配列を発現する組換えベクターを構築するため、当業者によく知られた方法を用いることができる。これら技術は、J. Sambrookら、上掲および F. M. Ausubelら、上掲とともに記載されている。

30

【0153】

R E T 1 6 ポリペプチドをコードする遺伝子は、R E T 1 6 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその断片を高レベルで発現する発現ベクターで細胞または組織を形質転換することにより作り出す (turned off) ことができる。そのような構築物は、翻訳できないセンスまたはアンチセンス配列を細胞中に導入するのに用いることができる。そのようなベクターは、D N A に組み込まれなくとも、内生のヌクレアーゼにより不能にされるまで R N A 分子を転写し続けることができる。一過性の発現は、非複製ベクターでは1ヶ月またはそれ以上、適当な複製配列をベクター系の一部に含めるようにデザインされておれば一層長い期間持続しうる。

40

【0154】

遺伝子発現の修飾は、R E T 1 6 ポリペプチドをコードする遺伝子の調節領域、5'領域、または制御領域 (たとえば、シグナル配列、プロモーター、エンハンサー、およびイントロン) に対するアンチセンス分子または相補的核酸配列 (D N A、R N A、または P N A) をデザインすることにより得ることができる。転写開始部位からのオリゴヌクレオチド、たとえば開始部位から - 1 0 と + 1 0 との間の位置からのオリゴヌクレオチドが好ましい。同様に、抑制は「三本鎖らせん」塩基対形成法を用いて達成できる。三本鎖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に十分なほど二本鎖らせんが開く能力を抑制するゆえに有用である。三本鎖 D N A を用いた近年の治療の進歩は記載されている (たとえば、J. E. Geeら、1994, In: B. E. Huberおよび B. I. Carr, Mole

50

cular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., マウントキスコ、ニューヨークを参照)。アンチセンス分子または相補的配列はまた、転写物がリボソームに結合するのを妨害することによって mRNA の翻訳を阻止すべくデザインすることもできる。

【0155】

リボザイム、すなわち酵素的 mRNA 分子もまた RNA の特異的開裂を触媒するのに用いることができる。リボザイム作用のメカニズムは、リボザイム分子の相補的な標的 RNA への配列特異的なハイブリダイゼーションと、それに続く内ヌクレオチド鎖分解的開裂を含む。適当な例としては、RET16 ポリペプチドをコードする配列内ヌクレオチド鎖分解的開裂を特異的かつ有効に触媒することのできる遺伝子操作により調製したハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が挙げられる。

10

【0156】

リボザイム開裂部位（以下の配列を含む：GUA、GUU、およびGUC）について可能性のある RNA 標的分子をスクニングすることにより、該標的 RNA 分子内の特異的なリボザイム開裂部位をまず同定する。同定されたら、開裂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、オリゴヌクレオチドを機能できなくさせ得る二次構造の特徴について評価することができる。候補標的の適切さはまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへの接近性（accessibility）を試験することによって評価することができる。

。

【0157】

本発明による相補的リボ核酸分子およびリボザイムは、核酸分子の合成のための当該技術分野で公知の方法により調製することができる。そのような方法としては、オリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法、たとえば固相ホスホルアミダイト化学合成法が挙げられる。別法として、RNA 分子はヒト RET16 をコードする DNA 配列のインビトロおよびインビボ転写により生成することができる。そのような DNA 配列を T7 や SP などの適当な RNA ポリメラーゼプロモーターを有する広範なベクター中に導入することができる。あるいは、相補的な RET16 RNA を構成的かまたは誘導性に合成する cDNA 構築物を細胞株、細胞、または組織に導入することができる。

20

【0158】

RNA 分子は、細胞内での安定性および半減期を増大すべく改変することができる。可能な改変としては、これらに限られるものではないが、分子の 5' 末端および / または 3' 末端へのフランキング配列の付加、または分子の骨格内での（ホスホジエステル結合の代わりに）ホスホルアミダイトまたは 2'-O-メチルの使用が挙げられる。この概念は PNA の生成に元々あるものであり、イノシン、キューオシン、およびワイプトシンなどの非伝統的な塩基、並びにアデニン、シチジン、グアニン、チミン、およびウリジンのアセチル、メチル、チオ、および内生のエンドヌクレアーゼによって容易に認識されない同様の修飾形を含めることによってこれら分子の全てに拡張することができる。

30

【0159】

細胞または組織中にベクターを導入する多くの方法が利用でき、インビボ、インビトロ、およびイクスピボに使用するのに同等に適している。イクスピボ療法のため、ベクターを患者から採取した幹細胞中に導入し、自家移植のためにクローン的に増殖させて同じ患者に戻すことができる。トランスフェクションによるおよびリボソーム注射による送達は、当該技術分野でよく知られた方法を用いて行うことができる。

40

【0160】

本発明の他の態様において、RET16 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補鎖、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターを、炎症性疾患または障害および / または制御されない細胞増殖、過剰活性または刺激に関連する疾患または障害を治療または予防すべく個体に投与することができる。様々な特殊化したオリゴヌクレオチド送達法、たとえば、RNA および DNA 送達のための単ラメラリボソーム中の包括および再構成センダイウイルスエンベロープを用いることができる（Aradら、1986、Bioc

50

hem. Biophys. Acta., 859: 88-94)。

【0161】

他の態様において、本発明のタンパク質、アンタゴニスト、抗体、アゴニスト、相補的配列、またはベクターを、他の適当な治療剤とともに投与することができる。組み合わせ療法に使用する適当な治療剤の選択は、通常の製薬原理に従って当業者により行うことができる。治療剤の併用は、相乗的に作用して上記の様々な障害を治療または予防することができる。このアプローチを用いれば各薬剤を一層低投与量で使用して治療効果を達成することができる、それゆえ副作用の可能性を低減することができる。

【0162】

上記の治療法はいずれも、たとえば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、および最も好ましくはヒトなどの哺乳動物を含む、そのような治療を必要とするあらゆる個体に適用することができる。

10

【0163】

スクリーニング法

RET16タンパク質および核酸は、炎症性障害、たとえば、活性化したおよび/または過剰活性の細胞（たとえば、T細胞、B細胞、内皮細胞、マクロファージ、好中球、肥満細胞および好酸球）が関与する障害を治療するための潜在的な使用について、RET16生物活性を変調する候補の生物活性剤のスクリーニングアッセイに用いることができる。さらに、RET16タンパク質およびコードする核酸、並びにRET16活性または機能を変調する生物活性剤は、細胞活性化を制御する方法においてエフェクターとして用いる

20

【0164】

RET16ポリヌクレオチドおよびポリペプチドはまた、相互作用性の分子によって変調することができる。本明細書において「変調」とは、RET16の生物活性を変えること、すなわちアゴニストによるなどで、増大、強化、または促進するか、またはアンタゴニストによるなどで、低減、抑制、または阻止することを意味する。好ましい態様において、RET16の生物活性は抑制される。RET16はTNF-アルファによって刺激された細胞で発現され、炎症応答に関与する因子であり候補ユビキチンリガーゼであることから、細胞内シグナル伝達において役割を果たし、または炎症プロセスの発生のマスタースイッチの一部として働くことができる。従って、RET16は、細胞シグナル伝達カスケードにおけるその機能または発現のアンタゴニストまたはインヒビターをスクリーニングするための標的として用いることができる。

30

【0165】

本発明の他の態様において、RET16タンパク質および核酸は、過剰活性化したB細胞および/またはT細胞によって引き起こされうる疾患、たとえば自己免疫疾患の治療、並びにサイトカイン、および炎症を促進、加速、または悪化させる因子を産生する細胞、たとえば白血球、肥満細胞、ナチュラルキラー細胞、好中球、マクロファージ、好酸球、多形核白血球などが関与する炎症性疾患、または種々の体組織における細胞傷害の治療のための潜在的な使用について、RET16の生物活性を変調する候補生物活性剤を同定および検出するためのスクリーニングアッセイに用いることができる。細胞内シグナル伝達カスケードのマスタースイッチをアップレギュレーション、刺激、またはその他で関与しうる炎症性疾患の制限されない例としては、関節炎（慢性関節リウマチおよび若年性慢性関節炎の両者）；乾癬；喘息；虚血-再灌流；臓器または組織移植の拒絶；慢性閉塞性肺疾患；炎症性胃腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎を含む）；亜急性（inacute）呼吸障害症候群；全身性エリテマトーデス、多発性硬化症および嚢胞性線維症が挙げられる。RET16を変調する生物活性剤を使用できる他の疾患または障害としては、自己免疫疾患、癌、腫瘍および新生物、および様々な組織、とりわけRET16の発現が認められない組織での細胞の制御されない増殖と関連する他の疾患が挙げられる（たとえば、図7A～図7Dを参照）。

40

【0166】

50

一般にそのようなスクリーニング法を行うに際しては、RET16ポリペプチドを、隔離した試料受容領域を有する不溶性の支持体（たとえば、マイクロタイタープレート、アレイなど）に非拡散的に結合させる。適当な不溶性支持体の基準は、ポリペプチドを結合できる限りいかなる組成からなっているてもよいこと、可溶性の物質から容易に分離できること、および他の面ではスクリーニング法の全体と適合できることである。そのような支持体の表面は固体または多孔性であってよく、いかなる都合のよいサイズまたは形状であってよい。適当な不溶性支持体の例としては、マイクロタイター、プレート、アレイ、メンブレンおよびビーズが挙げられる。これらは典型的にガラス、プラスチック（たとえば、ポリスチレン）、多糖、ナイロンまたはニトロセルロースで作る。マイクロタイタープレートおよびアレイは特に都合がよい、なぜなら少量の試薬および試料を用いて多数のアッセイを同時に行うことができるからである。ポリペプチドを結合させる特定の仕方は、本発明の試薬および方法全体と適合でき、ペプチドの活性が保持され、非拡散性である限り、重要ではない。

10

【0167】

好ましい結合法としては、抗体の使用（これは、その結合タンパク質へのRET16の結合を妨害してはならない）、「粘着性」またはイオン性の支持体への直接結合、化学的架橋などが挙げられる。ポリペプチドの結合後、過剰の未結合物質を洗浄により取り除く。ついで、必要なら試料受容領域をウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは他の無害/非反応性のタンパク質とともにインキュベートしてブロッキングすることができる。

【0168】

候補生物活性剤をアッセイに加える。新規の結合剤としては、特異的な抗体、化学ライブラリーのスクリーニングで同定した天然に存在しない結合剤、ペプチドアナログなどが挙げられる。特に興味を持たれるのは、ヒトの細胞に対して低い毒性を有する剤のスクリーニングアッセイである。この目的のために広範な様々なアッセイを用いることができ、たとえば、標識インビトロタンパク質-タンパク質結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合のためのイムノアッセイなどが挙げられる。本明細書で使用する「薬剤」なる語は、RET16タンパク質の生物活性を直接または間接に変える能力を有するあらゆる分子、たとえばタンパク質、オリゴペプチド、小さな有機分子、多糖、ポリヌクレオチドなどをいう。一般に、複数のアッセイ混合物を種々の濃度の剤で平行して行って、種々の濃度に対する異なる応答を得る。典型的に、これら濃度のうちの1つは負の対照、すなわちゼロの濃度、または検出レベル以下である。

20

30

【0169】

候補薬剤は、典型的には有機分子、好ましくは分子量が100を超えて約10,000ダルトン未満、好ましくは約2000~5000ダルトン未満（制限されない例として）の小さな有機化合物であるが、多くの化学クラスを包含する。候補薬剤は、タンパク質との構造的相互作用、とりわけ水素結合に必要な官能基を含み、典型的に少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2つの官能化学基を含む。候補薬剤はしばしば、環式炭素またはヘテロ環式構造および/または芳香族または多芳香族構造（上記官能基の1またはそれ以上で置換）を含む。候補薬剤はまた、ペプチド、糖、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、その構造的アナログまたはその組み合わせを含む生体分子にも見出される。

40

【0170】

候補薬剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む様々な採取源から得られる。たとえば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む、広範な様々な有機化合物および生体分子のランダムなおよび指令した合成を利用できる。あるいは、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーを利用できるかまたは容易に生成できる。さらに、天然または合成により生成したライブラリーおよび化合物は、通常の化学的、物理的および生化学的手段により容易に改変できる。既知の薬理的剤は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの指令したまたはランダムな化学的修飾に供して構造的なアナログを生成することができる。

50

【0171】

候補生物活性剤のRET16ポリペプチドへの結合の決定は、当該技術分野で実施されている多くの仕方で行うことができる。1つの側面において、候補生物活性剤を標識し、結合を直接決定する。スクリーニングアッセイが結合アッセイである場合は、1またはそれ以上の分子を標識に供し、その際、該標識は直接または間接に検出するシグナルを生成することができる。種々の標識には、放射性同位元素、蛍光および化学ルミネセンス化合物、特異的結合分子、粒子、たとえばマグネチック粒子などが含まれる。特異的結合分子としては、ビオチンとストレプトアビジン、ジゴキシンと抗ジゴキシンなどのペアが挙げられる。特異的結合成分については、相補的な成分を通常、公知の方法に従って検出を可能とする分子で標識する。幾つかの態様では1のみの成分を標識する。あるいは、1を超える成分を異なる標識で標識することができる；たとえば、RET16ポリペプチドを1の蛍光団で標識し、候補薬剤を他の蛍光団で標識することができる。

10

【0172】

1つの態様において、候補生物活性剤を標識する。標識した候補生物活性剤をRET16ポリペプチドとともに結合を形成するのに十分な時間（もしも存在するなら）インキュベートする。インキュベーションは最適な活性を容易にする温度、典型的に4～40で行うことができる。インキュベーション時間は最適活性のために選択するが、迅速な高処理量スクリーニングを容易にすべく最適化することもできる。典型的に0.1～1時間で充分である。過剰の試薬は一般に取り除くかまたは洗浄して除く。標識成分の存在または不在を検出して結合を決定し指示する。

20

【0173】

様々な他の試薬をスクリーニングアッセイに含めることができる。そのような試薬としては、これらに限られるものではないが、最適なタンパク質-タンパク質結合を容易にし、および/または非特異的なまたはバックグラウンドの相互反応を低減することのできる、塩、中性タンパク質、たとえばアルブミン、界面活性剤などが挙げられる。さらに、アッセイの効率を他の仕方でも改善する試薬、たとえば、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌剤などを用いることができる。さらに、本方法における成分の混合物は、必要な結合を提供するいかなる順で加えることもできる。

【0174】

キットが本発明の態様として含まれ、該キットは被験化合物をスクリーニングするのに必要な試薬を入れた容器を含む。試験のデザインおよび化合物の種類に応じて、そのようなキットはヒトRET16ポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよびアッセイを実施する教示を含んでよい。

30

【0175】

分子進化による本発明のRET16タンパク質の生物学的活性/機能的特徴の促進
知られた大抵の生物学的に活性なタンパク質の多くは生体内でのその特別の機能について極めて有効ではあるが、トランスジェニック、治療的、薬理的、および/または工業的な応用には望ましくないものにする特徴または特性を有する。これら特徴または特性のなかでも短い半減期が最も顕著な問題であり、これはタンパク質レベルでもタンパク質のmRNAレベルでも存在する。たとえば、半減期を延ばすことができることは、遺伝子療法、トランスジェニック動物の生成、バイオプロセッシング、タンパク質の製造および精製でのタンパク質の使用、およびとりわけ化学モデレーターとしてのタンパク質の使用に際して特に重要である。それゆえ、タンパク質の一般的な工業的および薬理的応用に加えて動物由来の疾患の治療用の治療剤としての応用を促進する特徴を有する単離タンパク質の新規な変異体を同定することの必要性が存在する。

40

【0176】

それゆえ、本発明の1つの側面に従い、本発明たとえばRET16ポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質の特定の特徴を指令(directed)分子進化により促進する能力が提供される。そのような促進は、制限されない例として、以下のような利点がある：キットにおける必須成分としての本発明の有用性；本発明の物理的な貢献、たとえばその溶解度

50

、構造、またはコドン最適化；本発明の特定の生物学的活性、たとえば関連酵素活性、タンパク質の酵素動力学、タンパク質の K_i 、 K_{cat} 、 K_m 、 V_{max} 、 K_d ；タンパク質-DNA結合活性；アンタゴニスト/抑制活性（直接または間接の相互作用を含む）；アゴニスト活性（直接または間接の相互作用を含む）；タンパク質の抗原性（たとえば、タンパク質の抗原性の可能性を増大または低減するのが望ましい）；タンパク質の免疫原性；タンパク質がそれ自体または他のタンパク質と二量体、三量体、またはマルチマーを形成する能力；および本発明の抗原性としての効力（疾患または疾患状態の予防的処置として、または標的疾患遺伝子に対するエフェクターとしてのその後の使用を含む）。さらに、タンパク質の特定の特徴を促進する能力はまた、特徴付けられた酵素の特徴を最初に特徴付けられた活性とは全く関係のない活性に変えることに応用できる。本発明の他の望ましい促進は個々のタンパク質に特異なものであり、それゆえ当該技術分野でよく知られており、本発明により包含されるであろう。

10

【0177】

たとえば、遺伝子操作したユビキチンリガーゼ酵素は、その基質との結合後に構成的に活性なものにすることができる。あるいは、遺伝子操作したユビキチンリガーゼ酵素は、基質結合の不在で構成的に活性なものにすることができる。さらに他の例として、遺伝子操作したユビキチンリガーゼ酵素は、ユビキチンリガーゼ酵素活性化に通常必要とされる制御因子および/または条件（たとえば、基質結合、リン酸化、コンホメーションの変化など）の全てよりも少ないもので活性化されうる。そのようなユビキチンリガーゼ酵素は、本明細書に記載した使用のなかでもとりわけ、ユビキチンリガーゼ酵素モデュレーターを同定するためのスクリーニングに有用である。あるいは、遺伝子操作したユビキチンリガーゼ酵素は、変化した基質特異性、および/または促進されたユビキチンリガーゼ酵素活性を有してよい。あるいは、遺伝子操作したユビキチンリガーゼ酵素は、低減したユビキチンリガーゼ酵素活性を有してよい。

20

【0178】

指令進化は幾つかの工程からなる。第一の工程は、目的とする遺伝子またはタンパク質についての変異体のライブラリーを確立する。ついで、最も重要な工程は同定すべき活性を備えた変異体を選択することである。スクリーニングのデザインは最も重要である、というのはスクリーニングは有用でない変異体を排除するに充分なほど選択的でなければならないが全ての変異体を排除してしまうほど厳格であってはならないからである。ついで、最後の工程は、その前のスクリーニングからの最良の変異体を用いて上記工程を繰返すことである。ついで、各連続サイクルは、たとえばスクリーニングの厳格さを増大させるなど必要に応じて改変することができる。

30

【0179】

DNAシャフリング反応を行うため、種々の反応条件を用いることができる。しかしながら、たとえばPNASUSA, 91: 10747 (1994)に記載されているように、DNAシャフリングの特別な反応条件が提供されている。簡単に説明すると、DNAシャフリング反応に供すべきDNA基質を調製する。調製は、DNAを単に混入細胞物質、化学物質、緩衝液、オリゴヌクレオチドプライマー、デオキシヌクレオチド、RNAなどから精製する形態であってよく、DNA精製キット、たとえばQiagen, Inc.やPromega, Corp.によって提供されるものなどを使用することができる。

40

【0180】

DNA基質が精製されたら、DNアーゼI消化に供する。約2~4 μg のDNA基質を100 μl の50 mM トリス-HCl、pH 7.4 / 1 mM MgCl_2 中の0.0015 単位/ μl のDNアーゼI (Sigma)で室温にて10~20分間消化する。ついで、得られた10~50 bpのDNA断片を、低融点アガロースゲル(2%)の電気泳動および/またはDE81イオン交換紙(Whatman)に供して精製する。あるいは、DNA断片の精製は、適当な分子量カットオフのMicroconコンセントレーター(Amicon)を用いて行うことができ、または当該技術分野で知られた他の方法に加えてオリゴヌクレオチド精製カラム(Qiagen)を用いることができる。DE81イオン交換紙を用いる場合は、1M NaC

50

1を用いて10～50bp断片を紙から溶離し、ついでエタノール沈殿させる。

【0181】

ついで、得られた精製断片を、PCR混合物(2mMの各dNTP、2.2mM MgCl₂、50mM KCl、10mMトリス・HCl、pH9.0および0.1% Triton X-100を含有)中に10～30ng/μlの最終断片濃度にて再懸濁することによってPCRアセンブリー反応に供する。この時点ではプライマーは加えない。Taq DNAポリメラーゼ(Promega)を100μlの反応混合物当たり2.5単位にて用いる。94℃で60秒、94℃で30秒、50～55℃で30秒および72℃で30秒のPCRプログラムを30～45サイクル、ついで72℃で5分間をMJ Research(ケンブリッジ、マサチューセッツ)PTC-150サーモサイクラーを用いて行う。

10

【0182】

アセンブリー反応が完了後、ついでプライマーなしで得られた生成物を0.8μmの各プライマーを含むPCR混合物(アセンブリー反応に用いたのと同じ緩衝液混合物を使用)に入れ、この混合物を15サイクルのPCR(94℃で30秒、50℃で30秒および72℃で30秒)に供する。好ましいプライマーは、シャフリング反応に用いたポリヌクレオチドの核酸配列に対応するものである。そのようなプライマーは、当該技術分野で知られ本明細書でも言及している方法を用いて修飾した核酸塩基対からなっていてよいし、またはさらなる配列(すなわち、制限部位の付加、特定の塩基対の変異などのため)を含んでいてもよい。かくして得られたシャフリングし、アセンブリーし、増幅した生成物は当該技術分野でよく知られた方法(たとえば、Qiagen PCR精製キット)を用いて精製し、

20

【0183】

今日まで多くのDNAシャフリングの改変法が刊行されているが、そのような改変法は当業者にはよく理解されており、本発明により包含される。DNAシャフリング法はまた、Zhaoら、1997, Nucl. Acid Res., 25(6): 1307-1308に記載されている方法を用いて所望のレベルの突然変異誘発を得るために改変することもできる。

【0184】

上記のように、ランダム化したプールが生成されたら、ついで所望の特性を有する変異体を同定すべく特定のスクリーニングに供することができる。変異体が同定されたら、ついで変異体に対応するDNAをDNA基質として用いて他のDNAシャフリングを開始することができる。このシャフリング、目的とする最適変異体の選択、および再シャフリングのサイクルを、最終的な変異体が得られるまで繰返すことができる。DNAシャフリング法を用いて生成した変異体を同定するのに適用するモデルスクリーニングの例は、以下の刊行物に見出すことができる: J. C. Mooreら、1997, J. Mol. Biol., 272: 336-347; F. R. Crossら、1998, Mol. Cell. Biol., 18: 2923-2931; およびA. Cramerら、1997, Nat. Biotech., 15: 436-438。

30

【0185】

DNAシャフリングには幾つかの利点がある。第一に、DNAシャフリングは有益な変異を用いる。DNAシャフリングは、スクリーニングと組み合わせると最良の変異の組み合わせの発見を可能とし、最良の組み合わせが集団中の全ての変異を含んでいることを想定しない。第二に、組換えが点変異と同時に生じる。小断片DNAプールから完全長遺伝子を合成することをDNAポリメラーゼに強いることの効果は、バックグラウンドの突然変異誘発率という結果となる。厳格な選択法と組み合わせると、酵素活性は野生型の酵素に比べて16000倍まで増大させることができた。本質的に、バックグラウンドの突然変異誘発は遺伝子変動性(genetic variability)を生成し、この遺伝子変動性に対して組換えは酵素活性を促進すべく作用する。

40

【0186】

組換えの第三の特徴は、有害な変異を除去するために用いることができることである。上記で検討したように、ランダム化のプロセスの際に各々の有益な変異について少なくとも1またはそれ以上の中立または抑制的な変異が生じうる。そのような変異は、アセンブリ

50

ー反応中に前の選択から選択した変異体のランダムサイズの断片に加えて過剰の野生型ランダムサイズ断片を加えることによって除去することができる。つぎの選択の際に、ポリヌクレオチド/ポリペプチド/酵素の殆どの活性変異体の幾つかは抑制的変異体を失っているに違いない。

【0187】

最後に、組換えは平行したプロセッシングを可能にする。このことは極めて有利である、というのはタンパク質を一層望ましいものにする複数の特徴(たとえば、溶解性、活性など)が存在しやすいからである。1を超える望ましい特徴または特性を一度にスクリーニングすることはますます困難であるので、分子進化の他の方法は抑制的となりやすい。しかしながら、組換えを用いれば種々の特性について最良の代表的変異体のランダム化断片を

10

【0188】

DNAシャフリングはまた、特定の宿主における免疫原性を低減するために本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに適用することができる。たとえば、DNAシャフリング法を用いて本発明の特定の変異体を生成し、単離することができる。そのような変異体は、その新規な固有の構造ゆえに宿主において高度に免疫原性であるかもしれないが、所望の特徴の全てを有していることができる。詳細には、所望の特徴はポリペプチドに非天然の構造を有するようにさせ、この構造がもはや「自己の」分子としては認識されず「外来のもの」として認識され、かくして新規な変異体に向けられた宿主の免疫応答を活性化することになる。そのような問題は、たとえば、天然タンパク質の生体異物オーソログの遺伝子配列のコピーを新規な変異体遺伝子の遺伝子配列とともにDNAシャフリングの1またはそれ以上のサイクルに含めることによって克服することができる。オーソログと新規な変異体DNAとのモル比はしかるべく変えることができる。理想的には、その結果得られる同定したハイブリッド変異体は、生体異物タンパク質を宿主の免疫系から回避させるコード配列の少なくとも幾つかと、所望の特徴を付与する元々の新規な変異体のコード配列とを含んでいる。

20

【0189】

同様に、本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの進化にDNAシャフリング法を適用することを包含し、その際、DNAシャフリングの1またはそれ以上のサイクルは、遺伝子鋳型DNAに加えて既知のアレル配列をコードするオリゴヌクレオチド、最適化コドン配列、既知の変異体配列、既知のポリヌクレオチド多型配列、既知のオーソログ配列、既知のホモログ配列、付加的な相同配列、付加的な非同相配列、他の種からの配列、およびこれらのあらゆる組み合わせを含む。

30

【0190】

上記方法に加え、ある種の場合にこの観点から適用でき、または望ましい多くの関連する方法がある。これら方法の代表例は、PCT出願WO98/31700およびWO98/32845(参照のため本明細書に引用する)に記載されている方法である。さらに、PCT出願WO98/13485、WO98/13487、WO98/27230、WO98/31837、およびA. Cramerら、1997, Nat. Biotech., 15: 436-438にそれぞれ記載されているように、遺伝子療法、タンパク質工学、変異体を含む全細胞の進化、または本発明のポリヌクレオチドを含む全酵素経路の進化に使用するための理想的な変異体を生成するため、本発明のポリヌクレオチド配列に関連法を適用することもできる。

40

【0191】

「DNAシャフリング」法を本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに適用するさらなる方法は、その提唱された適用も含めて米国特許第5,605,793号; PCT出願WO95/22625; PCT出願WO97/20078; PCT出願WO97/35966; およびPCT出願WO98/42832に見出すことができる。PCT出願WO00/09727はとりわけDNAシャフリングを除草剤選択的作物の同定に適用する方法を提供しており、これを本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに適用することができる。さらに、PCT出願WO00/12680は、植物種に検出可能な表現型特性を

50

付与するポリヌクレオチド配列を生成、改変、適合、および最適化する方法および組成物を提供している。上記の各出願は、全ての目的のためその全体を本明細書に引用する。

【0192】

医薬組成物

本発明のさらなる態様は、RET16核酸、コードされたポリペプチド、またはペプチド、RET16ポリペプチドに対する抗体、またはそのフラグメント、RET16ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのミメチック、アゴニスト（たとえば、アクチベーター）、またはアンタゴニスト（たとえば、インヒビター）を含む、生理的に許容しうるとおよび薬理的に許容しうる組成物を包含する。本発明にはまた、上記治療用の使用および効果のために、薬理的または生理的に許容しうる組成物を薬理的に許容しうる担体、希釈剤、または賦形剤とともに投与することが包含される。組成物は単独または少なくとも1の他の薬剤、たとえば安定化化合物と組み合わせて投与することができ、食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水を含む（これらに限られるものではない）滅菌した生体適合性の薬理的担体中にて投与することができる。組成物は、単独または他の薬剤、医薬、ホルモン、または生物応答調節剤と組み合わせて患者に投与することができる。

10

【0193】

本発明に使用する医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、くも膜下、脳室内、皮内、皮下、腹腔内、鼻内、経腸、局所、舌下、腔内、または直腸内手段を含む（これらに限られるものではない）多くの経路で投与することができる。

【0194】

医薬組成物は、活性成分（すなわち、RET16核酸、またはポリペプチド、またはその機能性の断片）に加えて適当な薬理的に許容しうる担体または賦形剤（活性成分を薬理的に使用できる調製物にプロセッシングするのを容易にする補助剤を含む）を含んでいてよい。製剤化および投与の技術に関するさらなる詳細は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., イーストン、ペンシルベニア)の最新版に記載されている。

20

【0195】

経口投与用の医薬組成物は、当該技術分野でよく知られた薬理的に許容しうる担体を用い、経口投与に適した剤型にて製剤化することができる。そのような担体は、患者が摂取するために錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ、スラリー、懸濁剤などに製剤化することを可能にする。

30

【0196】

経口使用のための医薬製剤は、活性成分を固形賦形剤と組み合わせ、得られた混合物を任意に破砕し、ついで所望なら適当な補助剤を加えた後に顆粒混合物を加工して錠剤または糖衣錠コアを得ることによって得ることができる。適当な賦形剤は、炭水化物または炭水化物充填剤、たとえば糖（ラクトース、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールを含む）；トウモロコシ、コムギ、コメ、ジャガイモ、または他の植物からのデンプン；セルロース、たとえばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースナトリウム；ガム（アラビアゴムおよびトラガカントゴムを含む）、およびゼラチンやコラーゲンなどのタンパク質である。所望なら、崩壊剤または可溶化剤、たとえば架橋ポリビニルピロリドン、アガー、アルギン酸、または生理学的に許容しうるその塩、たとえばアルギン酸ナトリウムを加えることができる。

40

【0197】

糖衣錠コアを生理学的に適したコーティング、たとえば濃縮した糖溶液（アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポルゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタンを含んでいてよい）、ラッカー（lacquer）溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物とともに用いることができる。染料または色素を製品の識別のため、または活性成分の量（すなわち、投与量）を特徴付けるために錠剤または糖衣錠のコーティングに加えることができる。

【0198】

50

経口で使用できる医薬製剤としては、ゼラチンで作られたプッシュフィットカプセル剤、並びにゼラチンおよびコーティング（グリセリンまたはソルビトールなど）で作られた軟計量カプセル剤が挙げられる。プッシュフィットのカプセル剤は、活性成分を充填剤または結合剤（ラクトースやデンプンなど）、滑沢剤（タルクやステアリン酸マグネシウムなど）、および任意に安定化剤と混合して含んでいてよい。軟カプセル剤では、活性化合物は適当な液体（脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールなど）中に安定化剤とともにまたは安定化剤なしで溶解または懸濁する。

【0199】

腹腔内投与に適した医薬製剤は、水溶液、好ましくは生理学的に適合しうる緩衝液（ハंक液、リンゲル液、または生理緩衝食塩水など）中で製剤化する。水性の注射懸濁液は、懸濁液の粘度を増大させる物質、たとえばカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランを含んでいてよい。さらに、活性化合物の懸濁液は、適当に油状の注射懸濁液として調製できる。適当な親油性の溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルやトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが挙げられる。任意に、懸濁液はまた、高度に濃縮した溶液の調製を可能とすべく、適当な安定化剤または化合物の安定性を増大する薬剤を含んでいてよい。

10

【0200】

局所または鼻内投与のためには、特定のバリアーを透過性にするのに適した浸透剤または透過剤を製剤に用いる。そのような浸透剤は当該技術分野で一般に知られている。

【0201】

本発明の医薬組成物は、当該技術分野で知られた仕方で、たとえば通常の混合、溶解、顆粒化、糖衣生成、すりつぶし、乳濁化、カプセル化、包括、または凍結乾燥プロセスにより製造することができる。

20

【0202】

医薬組成物は塩の形態で提供することができ、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などを含む（これらに限られるものではない）多くの酸を用いて製剤化することができる。酸は、対応の遊離塩基形態と比べて水性溶媒、または他のプロトン性溶媒中で溶解度が高い傾向がある。他の場合において、好ましい製剤は以下のいずれかまたは全てを含む凍結乾燥粉末であってよく：1～50 mMヒスチジン、0.1%～2%ショ糖、および2～7%マンニトール（4.5～5.5のpH範囲）、使用前に緩衝液と混合する。医薬組成物を調製後、適当な容器に入れ、指示した条件の処置について表示することができる。RET16生成物の投与のためには、そのような表示としては投与の量、頻度、および方法が挙げられる。

30

【0203】

本発明に使用するのに適した医薬組成物は、意図した目的を達成するのに有効な量で活性成分を含む組成物を包含する。有効な投与量または量の決定は、十分に当業者がなし得る範囲である。いずれの化合物についても、治療学的に有効な量は、たとえば新生物細胞を用いた細胞培養アッセイにて、または動物モデル（通常はマウス、ウサギ、イヌ、またはブタ）にて最初に評価することができる。動物モデルはまた、適当な濃度範囲および投与経路を決定するのにも用いることができる。ついで、そのような情報を用いてヒトの投与に有用な投与量および投与経路を決定するのに外挿することができる。

40

【0204】

治療学的有効量とは、症状または状態を改善、低減、または除去する、活性成分、たとえばRET16ポリペプチド、または活性なその断片、RET16ポリペプチドに対する抗体、RET16ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストの量をいう。治療の有効性および毒性は、細胞培養または実験動物における標準医薬手順、たとえばED₅₀（集団の50%において治療学的に有効な投与量）およびLD₅₀（集団の50%に致死的な投与量）により決定することができる。治療効果に対する毒性効果の投与量の比は治療指数であり、ED₅₀/LD₅₀の比として表すことができる。大きな治療指数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験で得られたデータは、ヒトに使用す

50

る投与量の範囲を決定するのに用いる。医薬組成物中に含まれる好ましい投与量は、毒性が殆どまたは全くなしのED50を含む循環濃度の範囲である。投与量は、使用した剤型、患者の感受性、および投与経路に応じて上記範囲内で変わるであろう。

【0205】

正確な投与量は、個々の必要な治療と関連した因子を考慮した実施者によって決定されるであろう。投与量および投与は、活性成分の十分なレベルを与えるよう、または所望の作用を保持するよう、調節する。考慮に入れる因子としては、個々の疾患状態の重篤さ、患者の一般的健康状態、年齢、体重、および性別、食事、投与の時間および頻度、薬剤の併用、反応の感受性、および治療に対する耐性/応答が挙げられる。一般的な手引きとして、長期間作用する医薬組成物は、特定の製剤の半減期およびクリアランス速度に応じて3~4日ごと、1週間ごと、または2週間ごとに投与することができる。

10

【0206】

通常、投与量は、投与経路に応じて0.1~100,000 μ gから合計約1gまでの範囲であってよい。特定の投与量および送達方法に関する手引きは文献に記載されており、一般に当該技術分野の実施者に利用できる。当業者であればヌクレオチドについてはタンパク質またはそのインヒビターとは異なる製剤を採用するであろう。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、位置などに特異的であろう。

【0207】

アッセイおよび診断

本発明の他の態様において、RET16タンパク質に特異的に結合する抗体は、RET16ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現（または過剰発現）を特徴とする状態または疾患の診断、RET16ポリペプチド、またはそのアゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターで処置した患者をモニターするアッセイに用いることができる。診断目的に有用な抗体は、治療法に使用するために上記に記載したのと同じ仕方で調製することができる。RET16ポリペプチドの診断アッセイとしては、抗体および標識を利用してヒトの体液または細胞もしくは組織の抽出物中のタンパク質を検出する方法が挙げられる。抗体は改変してまたは改変せずに用いることができ、共有結合によるかまたは非共有結合のいずれかによりリポーター分子に結合することにより標識することができる。当該技術分野で知られた広範な様々なリポーター分子を用いることができ、その幾つかは本明細書に記載してある。

20

30

【0208】

RET16ポリペプチドを測定するためのELISA、RIAおよびFACSを含む幾つかのアッセイプロトコールが当該技術分野で知られており、RET16ポリペプチド発現の変化したまたは異常なレベルを診断するための基礎を提供する。RET16ポリペプチド発現の正常なまたは標準の値は、正常な哺乳動物主体、好ましくはヒトから採取した体液または細胞抽出物をRET16ポリペプチドに対する抗体と複合体を生成するのに適した条件下で混合することにより確立される。標準的な複合体生成の量は、種々の方法により定量することができる；測光手段が好ましい。患者試料、対照試料、および生検組織からの疾患試料で発現されるRET16ポリペプチドの量を標準値と比較する。標準値と患者の値との間の偏差は疾患を診断するパラメータを確立する。

40

【0209】

本発明の他の態様に従い、RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを診断目的で用いることができる。使用できるポリヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド配列、相補的RNAおよびDNA分子、およびPNAが挙げられる。ポリヌクレオチドは、RET16ポリヌクレオチドの発現（または過少もしくは過剰発現）が疾患と相関関係を有する生検組織におけるRET16コード核酸配列の発現を検出および定量するのに用いることができる。診断アッセイは、RET16の不在、存在、および過剰発現を識別するため、および本発明の治療法の際にRET16ポリヌクレオチドレベルの制御をモニターするのに用いることができる。

【0210】

50

関連する側面において、RET16ポリペプチドまたは密接に関連する分子をコードするゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出することのできるPCRプローブとのハイブリダイゼーションを、RET16ポリペプチドをコードする核酸配列を同定するのに用いることができる。プローブの特異性、すなわちそれが高度に特異的な領域、たとえば5'調節領域中の約8ないし10または12または15の連続したヌクレオチドからできているのか、またはより特異的でない領域、たとえば特に3'非コード領域からできているのかという点、およびハイブリダイゼーションまたは増幅の厳格さは、プローブがRET16ポリペプチドをコードする天然の配列、そのアレル、または関連配列のみを同定するか否かを決定するであろう。

【0211】

プローブはまた関連配列の検出に用いることもでき、RET16ポリペプチドをコードするヌクレオチドの少なくとも50%、好ましくは80%以上を含んでいるのが好ましい。本発明のハイブリダイゼーションプローブはDNAまたはRNAであってよく、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列から、またはプロモーター、エンハンサー配列、および天然RET16タンパク質のイントロンを含むゲノム配列からのものであってよい。

10

【0212】

RET16ポリペプチドをコードするDNAの特定のハイブリダイゼーションプローブを製造する方法は、RET16ポリペプチド、またはRET16誘導体をコードする核酸配列のmRNAプローブ産生用ベクターへのクローニングを含む。そのようなベクターは当該技術分野で知られており、市販されており、適当なRNAポリメラーゼおよび適当な標識ヌクレオチドを加えることによりインビトロでRNAプローブを合成するのに用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブは、種々のデテクター/リポーター基、たとえば³²Pや³⁵Sなどの放射性核種、またはアビジン/ビオチン結合系によりプローブに結合したアルカリホスファターゼなどの酵素標識により標識することができる。

20

【0213】

RET16ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、患者生検からの流体または組織を用い、サザンまたはノーザン分析、ドットプロット、または他のメンブレンベースの方法；PCR法；またはディップスティック、ピン、ELISAまたはチップアッセイに用いてRET16の状態、たとえばRET16のレベルまたは過剰発現を検出し、または変化したRET16発現を検出することができる。そのような定性的または定量的方法は当該技術分野でよく知られている。

30

【0214】

特別の側面において、RET16ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、種々の炎症性疾患、新生物または癌、とりわけ上記に記載したものの活性化または誘発を検出するアッセイに有用である。RET16ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は標準法により標識することができ、ハイブリダイゼーション複合体を生成するのに適した条件下で患者からの流体または組織試料に加えることができる。適当なインキュベーション時間の後、試料を洗浄し、シグナルを定量して標準値と比較する。生検試料または抽出試料におけるシグナルの量が比較対照試料からのものに比べて有意に変わっておれば、該ヌクレオチド配列は試料中に存在するヌクレオチド配列とハイブリダイズしたのであり、試料中のRET16ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在または変化したレベルは関連する疾患の存在を示している。そのようなアッセイはまた、動物実験、臨床試験、または個々の患者の処置のモニタリングにおける特定の治療処置計画の有効性を評価するのに用いることもできる。

40

【0215】

RET16の発現と関連する疾患の診断の基礎を与えるため、正常なまたは標準の発現プロフィールを確立する。このことは、正常な主体（動物かまたはヒト）から採取した体液または細胞抽出物を、RET16ポリペプチドをコードする配列またはその断片とハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下で混合することにより達成することができる。

50

標準ハイブリダイゼーションの定量は、正常な主体から得た値を既知の実質的に精製したポリヌクレオチドを使用した実験で得られた値と比較することにより行うことができる。正常な主体から得た標準値を、疾患の症状を有する患者からの試料から得た値と比較することができる。標準値と主体（患者）の値との偏差を用いて疾患の存在を確立する。

【0216】

疾患が確立され、治療プロトコールが開始されたら、ハイブリダイゼーションアッセイを定期的に繰返して患者における発現レベルが正常個体で観察される発現レベルに近づいているか否かを評価することができる。連続したアッセイで得た結果は、数日から数ヶ月にわたる期間での治療の有効性を示すのに用いることができる。

【0217】

癌に関しては、個体からの生検組織中の異常な量の転写物の存在は、疾患の発症の素因を示すことがあり、急性の臨床徴候の出現前に疾患を検出する手段を提供することができる。このタイプの一層明確な診断は、健康の専門家が予防的手段またはより早期の攻撃的処置を採用することを可能とし、それによって癌の発生またはさらなる進行を防ぐことができる。

【0218】

RET16ポリペプチドをコードする核酸配列からデザインしたオリゴヌクレオチドの他の診断的用途は、PCRの使用を含む。そのようなオリゴヌクレオチドは、化学的に合成し、酵素を用いて生成し、または組換え源から生成することができる。オリゴマーは好ましくは2つのヌクレオチド配列を含み、1つはセンス方向（5'から3'方向）のものであり、他はアンチセンス方向（3'から5'方向）のものであって、特定の遺伝子または状態の同定に最適な条件下で用いる。同じ2つのオリゴマー、オリゴマーのネステッドセット、またはオリゴマーの縮重プールでさえも、密接に関連したDNAまたはRNA配列の検出および/または定量のためにより厳格でない条件下で用いることができる。

【0219】

RET16の発現を定量するのに適した方法としては、ヌクレオチドの放射性標識またはビオチン化、対照核酸の同時増幅、および実験結果を外挿する標準曲線が挙げられる（P. C. Melbyら、1993, *J. Immunol. Methods*, 159: 235-244; およびC. Duplaaら、1993, *Anal. Biochem.*, 229-236）。複数の試料の定量スピードは、目的オリゴマーを種々の希釈で提示し、分光測光応答または比色応答が迅速な定量を与えるELISA形態のアッセイを行うことにより加速することができる。

【0220】

本発明の他の態様において、本明細書に記載するRET16ポリヌクレオチド配列に由来するオリゴヌクレオチド、またはより長い断片は、マイクロアレイにおいて標的として用いることができる。マイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルを同時にモニターしたり（転写像を生成する）、遺伝子変異体、変異および多型を同定するのに用いることができる。この情報は、遺伝子機能の決定、疾患の遺伝子ベースでの理解、疾患の診断、および治療剤の開発およびその活性のモニターに用いることができる。特別の態様において、マイクロアレイは、WO95/11995（Cheeら）；D. J. Lockhartら、1996, *Nature Biotechnology*, 14: 1675-1680; およびM. Schenaら、1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93: 10614-10619に記載された方法に従って調製および使用することができる。マイクロアレイはさらにP. Lalらの米国特許第6,015,702号に記載されている。

【0221】

本発明のさらなる態様において、RET16ポリペプチドをコードする核酸配列はまた、天然のゲノム配列のマッピングに有用なハイブリダイゼーションプローブを生成するのに用いることもできる。配列は、C. M. Price, 1993, *Blood Rev.*, 7: 127-134およびB. J. Trask, 1991, *Trends Genet.*, 7: 149-154に概説されているように、特定の染色体、染色体の特定の領域、または人工染色体構築物（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、細菌PI構築物、または単一染色体cDNAライブラリーにマッピングすることができる。

10

20

30

40

50

【0222】

本発明の他の態様において、RET16ポリペプチド、その触媒的または免疫原性の断片またはオリゴペプチドは、様々な医薬スクリーニング法のいずれにおいても化合物のライブラリーをスクリーニングするのに用いることができる。そのようなスクリーニングに用いる断片は、溶液中に遊離の状態、固相支持体に付着、細胞表面上に生成、または細胞内に位置してよい。RET16ポリペプチドまたはその部分と試験した薬剤との結合複合体の生成は、当該技術分野で通常実施され上記に記載した方法を用いて測定することができる。

【0223】

使用できる医薬スクリーニングの他の方法は、WO84/03564に記載されているように、目的タンパク質に対する適した結合親和性を有する化合物の高処理量スクリーニングを提供する。この方法では、RET16タンパク質に適用する場合、多数の異なる小さな被験化合物を固相基体、たとえばプラスチックピンまたは他の表面上に合成する。被験化合物をRET16ポリペプチドまたはその断片と反応させ、洗浄する。ついで、結合したRET16ポリペプチドを当該技術分野で知られた方法により検出する。上記医薬スクリーニング法に使用するため、精製したRET16ポリペプチドをプレート上に直接コーティングすることもできる。あるいは、非中和抗体を用いてペプチドを捕捉し、固相支持体上に固定化することができる。

【0224】

所定のタンパク質、すなわちRET16タンパク質に結合することのできる小さな分子の検出または同定を含む他のスクリーニングおよび小分子（たとえば、医薬）検出アッセイが本発明により包含される。特に好ましいのは、高処理量スクリーニング法に適したアッセイである。そのような結合ベースのスクリーニングまたは検出アッセイでは、機能的なアッセイは一般に必要ではない。必要なのは、標的タンパク質、好ましくは実質的に精製したもの、および該タンパク質標的への結合についてスクリーニングまたはアッセイすべき化合物（たとえば、リガンド、医薬、小分子）のライブラリーまたはパネルだけである。好ましくは、標的タンパク質に結合する大抵の小分子は、該タンパク質の機能性の領域または部位に優先的にかつ一層高い親和性にて結合するため、何らかの仕方で活性を変調させるであろう。

【0225】

そのようなアッセイの例は、Pantolianoらの米国特許第6,020,141号および同第6,036,920号に記載されている（J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8)をも参照）蛍光ベース熱シフトアッセイ（3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP、エクソン、ペンシルベニア）である。このアッセイは、タンパク質 - 医薬またはリガンド複合体の熱変性曲線を分析することにより、発現され好ましくは精製したRET16ポリペプチドに結合する小分子（たとえば、医薬、リガンド）の検出を結合決定基の親和性に基づいて可能にする。この方法で決定した医薬または結合分子は、所望なら本明細書に記載した方法などの方法によりさらにアッセイして、該分子が標的タンパク質の機能または活性に影響を及ぼすあるいは変調するか否かを決定することができる。

【0226】

本発明のさらなる態様において、競合医薬スクリーニングアッセイを用いることができ、この場合、RET16ポリペプチドに結合することのできる中和抗体がRET16ポリペプチドへの結合に対して被験化合物と特異的に競合する。この方法では、これら抗体を用い、RET16ポリペプチドと1またはそれ以上の抗原決定基が共通するペプチドの存在を検出することができる。

【0227】

トランスジェニックおよびノックアウト

本発明はさらに、配列番号2または配列番号4のアミノ酸配列を含むヒトRET16をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物、好ましくはマウスを包含する。

10

20

30

40

50

【0228】

組換えタンパク質を産生するのに有用なトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、それに必要な発現ベクターおよびトランスジェニック動物を生成する技術と同様、熟練した実施者によく知られている。一般に、トランスジェニック動物は組換え発現ベクターを含んでいるが、該組換え発現ベクターでは、ヒトRET16をコードする核酸配列が組織特異的なプロモーターに作動可能に連結して含まれており、それによってコード配列が該特異的組織でのみ発現される。たとえば、組織特異的なプロモーターは哺乳動物細胞特異的なプロモーターであってよく、かくして発現された組換えタンパク質は動物の乳から回収する。

【0229】

ヒトRET16をコードする核酸分子を含むトランスジェニック動物、とりわけトランスジェニックマウスは、RET16の過剰発現をインビボで調べる動物モデルとして、並びに医薬評価、およびRET16の活性を抑制または変調するのに有効な化合物、たとえば炎症性障害、疾患、または状態を治療するための化合物を探索する活動に使用することができる。当業者であれば、標準技術、たとえばWagnerの米国特許第4,873,191号(1989年10月10日発行)およびLederの米国特許第4,736,866号(1988年4月12日発行)に教示されているものを用い、ヒトRET16を生成するトランスジェニック動物を産生し、該動物を医薬評価や新規発見プロジェクトに用いることができる。

10

【0230】

本発明の他の側面は、ノックアウトマウスおよびその使用方法に関する。とりわけ、よく知られた方法を用いて動物に導入した変異した非機能性のRET16遺伝子についてホモ接合性であるトランスジェニックマウスを生成することができる。ノックアウトマウスは機能性のRET16を産生しないため、RET16の機能を調べるのに有用である。さらに、ノックアウトマウスは、RET16を欠く動物における被験化合物の効果を調べるアッセイに用いることができる。たとえば、RET16を欠くマウスは、RET16インヒビターが動物に作用を及ぼすか否か、どのようにして、またどの程度作用を及ぼすかを決定するのに用いることができ、それゆえ該分子の活性を抑制することに関連する懸念に対処することができる。

20

【0231】

遺伝的に欠失した「ノックアウト」マウスを生成する方法はよく知られており、M. R. Capocchi, 1989, Science, 244: 1288-1292およびP. Liら、1995, Cell, 80: 401-411に開示されている。たとえば、マウス(またはヒト)RET16 cDNAクローンを用いてマウスRET16ゲノムクローンを単離することができる。ゲノムクローンを用い、マウス中のRET16遺伝子を相同組換えにより破壊することのできるRET16ターゲティング構築物を調製できる。ターゲティング構築物はRET16遺伝子の非機能性の部分を含んでおり、これが天然のマウス遺伝子の機能性の部分の代わりに挿入される。非機能性の挿入は、一般に、RET16の活性領域をコードするエクソン中の挿入を含む。ターゲティング構築物は、正および負の両選択のためのマーカーを含んでいてよい。正の選択マーカーは該マーカーを含んでいない細胞の選択的排除を可能とし、一方、負の選択マーカーは該マーカーを含む細胞の排除を可能とする。

30

40

【0232】

たとえば、第一の選択マーカーは正のマーカーであって、該マーカーを含む細胞の生存を可能にするであろう。ある場合には、第一の選択マーカーはネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子であり、これをRET16遺伝子のコード配列中において該遺伝子を非機能性にする一方、同時に構築物を選択的にすることができる。抗生物質耐性遺伝子は、天然配列と組み換えることのできる相同領域内にある。それゆえ、相同組換えの後、非機能性の遺伝子配列および抗生物質耐性遺伝子配列が取り込まれるであろう。ノックアウトマウスは、炎症関連障害を調べたりこれら障害を治療する化合物をスクリーニングするためのモデルとして用いることができる。

【0233】

50

ターゲティング構築物はまた、負の選択マーカである第二の選択マーカをも含んでいる。負の選択マーカを有する細胞は排除されるであろう。第二の選択マーカは、組換え領域の外側にある。それゆえ、全構築物が細胞内に存在しておれば両マーカが存在するであろう。もしも構築物が天然の配列と組換えを起こせば、第一の選択マーカはゲノム中に取り込まれ、第二のマーカは失われるであろう。単純ヘルペスウイルスチミンキナーゼ (H S V t k) 遺伝子は負の選択マーカの例であり、これを第二のマーカとして用いてこれを含む細胞を排除することができる。H S V t k 遺伝子を有する細胞はガンシクロピアの存在下で選択的に殺される。

【0234】

細胞をターゲティング構築物でトランスフェクションし、ついで第一の選択マーカの存在および第二の選択マーカの不在について選択する。ついで、構築物/DNAを胚盤胞段階に注射し、偽妊娠のメスに移植する。組換え遺伝子とその生殖細胞に移すことのできるキメラ子孫を選択し、交配し、その子孫を組換え遺伝子のヘテロ接合性キャリアについて調べる。ついで、ヘテロ接合性の子孫の交配を用いてRET16欠失ノックアウトマウスを構成する完全にホモ接合性の子孫を生成することができる。

【0235】

本発明の他の態様は、RET16ポリヌクレオチドおよびコードされたポリペプチド、その断片、またはそれに対する抗体の使用法を包含する。さらに詳細には、そのような方法は、試料中のポリヌクレオチド配列に特異的に結合する分子または化合物を精製するために該ポリヌクレオチドを使用する方法を含む。そのような方法は、本発明のRET16ポリヌクレオチドと試料中の分子または化合物との特異的結合を検出し；結合したポリヌクレオチドを回収し；ついで該ポリヌクレオチドを該分子または該化合物から分離し、それによって精製した分子または化合物を得ることを含む。

【0236】

本発明による他の方法は、細胞シグナル伝達タンパク質、たとえばRET16の活性を変調することのできる候補化合物をスクリーニングことに関し、被験化合物、たとえばアントゴニストまたはアゴニストをRET16タンパク質、またはその機能性の断片を発現する細胞または組織と接触させ、ついで細胞シグナル伝達カスケードに参与するRET16タンパク質の活性を変調する被験化合物を候補変調化合物として選択することを含む。そのような方法において、RET16細胞シグナル伝達カスケードタンパク質活性は、第二の細胞内細胞シグナル伝達タンパク質の相互作用ドメインへの結合であってよい。

【0237】

本発明によって包含される他の方法は、RET16細胞シグナル伝達タンパク質またはその断片に結合することのできる候補化合物のスクリーニングに関し、被験化合物を、(i)本発明によるRET16細胞シグナル伝達タンパク質を発現する細胞または組織、または(ii)その単離タンパク質と接触させ、ついでRET16細胞シグナル伝達タンパク質に結合する被験化合物を選択することを含む。

【0238】

本発明の他の方法は、RET16タンパク質と第二の細胞シグナル伝達タンパク質との結合を促進、増大、または加速させる化合物を同定するための化合物のスクリーニング法である。そのような方法は、被験化合物の存在下または不在下、本発明によるRET16タンパク質を該タンパク質と結合または会合する第二のシグナル伝達分子と、結合を可能とする条件下で接触させ、ついで被験化合物の存在下での結合レベルを被験化合物の不在下での結合レベルと比較することにより、第二の細胞シグナル伝達分子へのRET16タンパク質の結合レベルが促進、増大または加速されたか否かを決定することを含む。上記方法は高処理量スクリーニングにより行うのに適していることが評価されるであろう。

【0239】

実施例

以下の実施例は本発明を説明するために提供されるのであって、本発明を限定することを

意図するものではない。これら実施例は、使用した従来法、たとえばベクターの構築、cDNAのそのようなベクター中への導入、または得られたベクターの適当な宿主への導入などの詳細な記載は含んでいない。そのような方法は当業者によく知られており、多くの刊行物、たとえばSambrook, FritschおよびManiatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、米国に記載されている。

【0240】

実施例 1

方法

A. ヒトRET16完全長ORFコード配列の単離

RET16の予測されるコード配列を含むクローンを、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)で6時間処理したヒト微細血管内皮細胞(HMVEC)から逆転写/複製連鎖反応(RT/PCR)を用いて単離した。以下の条件を用い、3つのプライマーセット(各400nMの最終濃度)を用いて1532bp配列を増幅した:

JNF346(5'-TCACCTGCGCGGCACGTGACCC-3')(配列番号17);

JNF493(5'-TTTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCC-3')(配列番号18);

JNF494(5'-TTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCCATCTATTGATGTC-3')(配列番号19)、

250μlの反応液中の200μM dNTP、1×アドバンテージ2ポリメラーゼPCR緩衝液、1×アドバンテージ2ポリメラーゼ、および2.0μl DNA。94で30秒、68で30秒、および72で2分の実験サイクルを35サイクル行った。反応完了後、6.0μlの負荷染料を加え、臭化エチジウムを含む1.2%アガロースゲルでのゲル電気泳動により全反応を分離した。~1.6kbのサイズのバンドをゲルから切り出し、QIAgenゲル抽出キット(QIAgen、バレンシア、カリフォルニア)を用いて精製した。この断片をpTAdvクローニングベクター(Clontech、パロアルト、カリフォルニア)にライゲートし、標準法を用いてシークエンシングした。RET16pTAdv_Endo_01は、予測されたRET16コード配列に対応する1532bp配列を含んでいる。

【0241】

RET16ポリペプチドをコードする核酸配列は、TNF-アルファ刺激したヒト肺微細血管内皮細胞(HMVEC)からのサブトラクシオンライブラリーからまず同定した。このサブトラクシオンクローン配列は、630bpの部分cDNA配列(配列番号5; 図4Cに示す)をコードしていた。コンセンサス配列(配列番号1; 図1および図3)は、以下の重複および/または拡張核酸配列から得た: Incyteクローン2552523(LUNGUT06)、4632828(GBLADIT02)、1687704(PROSTUT10)、2674742(KIDNNOT19)、およびパブリックESTクローンAI187875(testis)。

【0242】

B. マウスRET16遺伝子オーソログの同定

ヒトRET16遺伝子のマウスオーソログを同定するため、huRET16のコード配列を用いて上記マウスESTデータベースに対して探索した。幾つかのマウスESTが同定された。それらは以下のとおりである: AU035693、AA118718、AA204608、W41056、AW146018、AI450495、AI875443、AI316544、AW494796、AW146018およびBE983890。muRET16核酸配列は、huRET16と80%の同一性を有している。muRET16アミノ酸配列は、huRET16と82.5%同一である(86.5%の類似性)。muRET16は7つの予測されたWDリピートおよび1つのSAMドメインを有しており、全てスコアは>10であった。

【0243】

10

20

30

40

50

C. ヒトRET16遺伝子のゲノム構成

RET16遺伝子配列を含むゲノムクローンを同定した。クローンhRPK.35_A_1 (ジーンバンクANAC006501)を用いてRET16のエクソン-イントロン境界を解読した(図18)。RET16は11のエクソン断片からなっている。エクソン1はヌクレオチド1~123からなる。エクソン2はヌクレオチド124~545からなる。エクソン3はヌクレオチド546~730からなる。エクソン4はヌクレオチド731~823からなる。エクソン5はヌクレオチド824~917からなる。エクソン6はヌクレオチド918~951からなる。エクソン7はヌクレオチド952~992からなる。エクソン8はヌクレオチド993~1099からなる。エクソン9はヌクレオチド1100~1279からなる。エクソン10はヌクレオチド1280~1420からなる。エクソン11はヌクレオチド1421~1810からなる。エクソン11の次にはポリAテールが続く。ポリアデニル化部位(AATAA)は1795~1799に位置する。AC006501によれば、イントロン1~イントロン10は、それぞれ長さが3489、2755、4123、3750、11859、1824、80、1382、7683、および12181ヌクレオチドである。

【0244】

D. 細胞培養のためのHMVEC

単一のドナーからのヒト肺微細血管内皮細胞の一次培養を、Clontech(サンジエゴ、カリフォルニア)から得た。提供されたプロトコールに従い、細胞を内皮細胞増殖対置-キット(CC-3202)中、5%ウシ血清アルブミン(Hyclone、ローガン、ユタ)とともに増殖させた。細胞をトリプシン処理により継代した。細胞をまずT-25組織培養フラスコに接種し、約90%のコンフルエンスに達した後、ついでT-225組織培養フラスコに 1.2×10^6 細胞/フラスコにて継代した。細胞が約90%のコンフルエンスに達するまで増殖したら、T-225フラスコに 1.8×10^6 細胞/mlにて継代し、接種した。正常な増殖条件のため、培地を48時間ごとに交換した。

【0245】

E. RNA単離のためのHMVEC細胞処理

HMVEC細胞のサブコンフルエントな(すなわち、90%コンフルエント)T-225フラスコを、培地を除いてフラスコ当たり40mlの培地に調節した。フラスコの幾つかを10ng/mlのTNF-アルファで1時間、6時間および24時間処理し;他のフラスコは対照としてTNF-アルファで処理しなかった。TNF-アルファ処理した細胞を未処理の細胞と比較した。TNF-アルファを添加する時点では培地を交換しなかった。

【0246】

F. RNAの単離

HMVEC細胞の処理フラスコをトリプシンで簡単に処理した(フラスコ当たり10mlのトリプシン)。ウシ血清アルブミンを50%の最終濃度で添加することによりトリプシン処理を終了させ、フラスコをPBS、pH7.4(Gibco、グランドアイランド、ニューヨーク)で濯いだ。フラスコからのプールした細胞およびPBS濯ぎ液をプールし、10分間遠心分離し($534 \times g$)、細胞ペレットをPBSに再浮遊し、再度遠心分離にかけた。上澄み液を除去し、細胞ペレットをRNA単離に用いた。ポリA+RNAをFast Track 2.0TM(Invitrogen、カールスバード、カリフォルニア)を用いて直接単離した。

【0247】

G. サブトラクションライブラリーの構築

PCRセレクトcDNAサブトラクションキットTM(Clontech、パロアルト、カリフォルニア)を用い、製薬会社のプロトコールに従って未処理のHMVECポリA+RNA(テスター)および1時間TNF処理したHMVECポリA+RNA(ドライバー)からサブトラクションライブラリーを生成した。10の二次PCR反応を組み合わせ、2%アガロースゲル上で泳動した。約0.3kb~10kbの範囲の断片をQIAgenゲル抽出キット(QIAgen、パレンシア、カリフォルニア)を用いてゲル精製し、TAKクローニングベクター-pCR2.1(Invitrogen)に挿入した。TOP10F'コンピテント大腸菌(Invitro

10

20

30

40

50

gen) を形質転換し、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを入れた LB プレート上にプレATING した。クローンを単離し、同様の濃度のアンピシリンを含む LB ブロスで増殖させた。プラスミドを標準法に従ってシーケンシングした。

【0248】

H. 多組織ノーザンプロトコール

多組織ノーザンプロット (MTN) を Clontech (パロアルト、カリフォルニア) から入手した。使用した MTN は、ヒト MTN (#7760-1)、ヒト MTN II (#7759-1)、ヒト MTN III (#7767-1)、およびヒト癌細胞株 MTN (#7757-1) であった、

【0249】

メンブレンを ExpressHyb ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) で 68 °C にて 1 時間プレハイブリダイズし、ついで以下のように調製した ^{32}P 標識プローブと 2 時間ハイブリダイズした: 元々の単離 RET16 サブトラクショナルクローンを EcoRI 制限エンドヌクレアーゼ (Life Technologies、ゲイサーズバーグ、メリーランド) で消化した。540 bp の部分 cDNA 断片を、ランダムプライムド標識キット (Roche Biochemicals、インディアナポリス、インディアナ) を用い、製薬業社の教示に従って ^{32}P -dCTP で標識した。放射性プローブを、 2×10^6 カウント/分/ml (ハイブリダイゼーション溶液) の比活性にて加えた。

【0250】

ハイブリダイゼーション後、メンブレンを低ストリンジェンシー溶液 ($2 \times \text{SSC}/0.05\% \text{SDS}$) とともに室温で 30 分間連続振盪し、溶液を 2 回交換することによって洗浄した。ついで、メンブレンを高ストリンジェンシー溶液 ($0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$) で室温にて 30 分間洗浄した (溶液を 1 回交換)。メンブレンを強化スクリーンとともに X 線フィルムに -70°C にて 10 日間暴露した (図 7A ~ 7D)。

【0251】

実施例 2

huRET16 の別のスプライス変異体

RET16 (本明細書では RET16.1 ともいう) の 2 つの別のスプライス形、すなわち RET16.2 および RET16.3 を同定した。RET16.2 は PCR 増幅を用いて TNF- α 処理したヒト微細血管内皮細胞から単離した。簡単に説明すると、RET16 の完全長のコード配列のクローニングを試みるなかで、1500 bp の RET16 アンプリマーに加えてより小さなサイズの第二のバンドを増幅した。この第二のアンプリマーは、1300 bp よりもわずかに小さく移動した。両断片を pTAdvTAK クローニングベクターにクローニングし、シーケンシングした。RET16 からのエクソン断片を第二のアンプリマー配列 (RET16.2 という; RET16 のスプライス変異体) とアラインメントした。RET16.2 では 4 つのエクソンが欠失していることがわかった。これらエクソンはエクソン 5 ~ 8 であり、WD リピート #6 および #7 に対応する。RET16.2 の cDNA クローンは、ブダベスト条約の規定に従い、ATCC に受託番号 PTA-3161 にて 2001 年 3 月 7 日に寄託してある。従って、本発明は ATCC 受託番号 PTA-3161 を含む RET16.2 cDNA 核酸配列を提供する。

【0252】

第二の RET16 スプライス変異体 (RET16.3) を、Incyte クローン同定ナンバー 3111127 (Incyte Genomics、パロアルト、カリフォルニア) で同定した。クローン 3111127 をシーケンシングしたところ余分のエクソン断片 (9X) を含むことがわかった。このエクソンはエクソン 9 とエクソン 10 との間に挿入されている。このエクソンのアミノ酸配列は極めて疎水性である。RET16.3 変異体のアミノ酸配列を SEQ-WEB で分析したところ、膜貫通ドメインの存在が示された。この余分のエクソンはまた SAM ドメインを破壊する。RET16.3 スプライス変異体の cDNA クローンは、ブダベスト条約の規定に従い、ATCC に受託番号 PTA-3161 にて 2001 年 3 月 7 日に寄託してある。また、本発明は ATCC 受託番号 PTA-3161 を含む RE

10

20

30

40

50

T 1 6 . 3 c D N A 核 酸 配 列 を 提 供 す る 。

【 0 2 5 3 】

A . R E T 1 6 . 2 核 酸 配 列 の 同 定 (図 1 9 A お よ び 1 9 B)

ヒト R E T 1 6 (R E T 2 1 . 1) に つ い て 記 載 し た よ う に 、 R E T 1 6 の 予 測 さ れ る コー ド 配 列 を 含 む ク ロ ー ン を 、 腫 瘍 壊 死 因 子 ア ル ファ (T N F) で 6 時 間 処 理 し た ヒ ト 微 細 血 管 内 皮 細 胞 (H M V E C) か ら 逆 転 写 / 複 製 連 鎖 反 応 (R T / P C R) を 用 い て 単 離 し た 。 以 下 の 条 件 を 用 い 、 3 つ の プ ラ イ マー セ ッ ト (各 4 0 0 n M の 最 終 濃 度) を 用 い て 1 5 3 2 b p 配 列 を 増 幅 し た :

J N F 3 4 6 (5 ' - T C A C C T G C G C G G C A C G T G A C C C - 3 ') (配 列 番 号 1 7) ;

J N F 4 9 3 (5 ' - T T T A C T T T T G G T G T G T C T C C A G C C - 3 ') (配 列 番 号 1 8) ;

J N F 4 9 4 (5 ' - T T A C T T T T G G T G T G T C T C C A G C C A T C T A T T G A T G G C - 3 ') (配 列 番 号 1 9) 、

2 5 0 μ l の 反 応 液 中 の 2 0 0 μ M d N T P 、 1 × ア ド バ ン テー ジ 2 ポ リ メ ラー ゼ P C R 緩 衝 液 、 1 × ア ド バ ン テー ジ 2 ポ リ メ ラー ゼ 、 お よ び 2 . 0 μ l D N A 。 9 4 ° C で 3 0 秒 、 6 8 ° C で 3 0 秒 、 お よ び 7 2 ° C で 2 分 の 実 験 サ イ ク ル を 3 5 サ イ ク ル 行 っ た 。 反 応 完 了 後 、 6 . 0 μ l の 負 荷 染 料 を 加 え 、 臭 化 エ チ ジ ウ ム を 含 む 1 . 2 % ア ガ ロ ー ス ゲ ル で の ゲ ル 電 気 泳 動 に よ り 全 反 応 を 分 離 し た 。 1 . 6 k b の R E T 1 6 . 1 転 写 物 に 加 え 、 1 . 3 k b の R E T 1 6 . 2 転 写 物 を ゲ ル か ら 切 り 出 し 、 Q I A g e n ゲ ル 抽 出 キ ッ ト (Q I A g e n 、 バ レ ン シ ア 、 カ リ フ ォ ル ニ ア) を 用 い て 精 製 し た 。 こ の 断 片 を p T A d v ク ロ ー ニ ン グ ベ ク ター (C l o n t e c h 、 パ ロ ア ル ト 、 カ リ フ ォ ル ニ ア) に ラ イ ゲー ト し 、 標 準 法 を 用 い て シー ク エ ン シ ン グ し た 。 変 異 体 R E T 1 6 . 2 (R E T 1 6 p T A d v _ E n d o _ 0 3) (配 列 番 号 1 2) は 、 予 測 さ れ た R E T 1 6 コー ド 配 列 に 対 応 す る 1 2 7 2 b p 配 列 を 含 ん で い る こ と が わ か っ た が 、 エ ク ソ ン - イ ン ト ロ ン 構 造 の 分 析 は エ ク ソ ン 5 ~ 8 の 欠 失 を 明 ら か に し た 。 R E T 1 6 . 2 の 導 き 出 し た ア ミ ノ 酸 配 列 は 配 列 番 号 1 3 に 示 し て あ る 。

【 0 2 5 4 】

B . R E T 1 6 . 3 核 酸 配 列 の 同 定 (図 2 0 A お よ び 2 0 B)

5 ' E S T を I n c y t e E S T デー タ ベー ス か ら 同 定 し 、 I n c y t e G e n o m i c s (パ ロ ア ル ト 、 カ リ フ ォ ル ニ ア) か ら 購 入 し た 。 こ の ク ロ ー ン を 製 造 業 社 の プ ロ ト コー ル に 従 っ て 調 製 し 、 シー ク エ ン シ ン グ し た 。 ク ロ ー ン I D 3 1 1 1 1 2 7 内 に 含 ま れ る 配 列 は R E T 1 6 (R E T 1 6 . 1 と も い う) に 対 応 す る こ と が わ か っ た が 、 エ ク ソ ン 9 と エ ク ソ ン 1 0 と の 間 に さ ら な る 断 片 が 存 在 し て い た 。 こ の エ ク ソ ン は 7 8 ヌ ク レ オ チ ド 長 で あ り 、 配 列 の 読 取 り 枠 を 変 更 さ ず 、 付 加 的 な 2 3 ア ミ ノ 酸 残 基 を タ ン パ ク 質 配 列 に 付 加 す る 。 こ の 配 列 は 極 め て 疎 水 性 で あ る 。 こ の I n c y t e 3 1 1 1 1 2 7 挿 入 は 長 さ が 1 9 0 8 b p で あ る 。 こ の 変 異 体 は 本 明 細 書 で は R E T 1 6 . 3 と 称 し 、 そ の 導 か れ た ア ミ ノ 酸 配 列 は 配 列 番 号 1 5 に 示 し て あ る 。

【 0 2 5 5 】

実 施 例 3

R T - P C R に よ る ヒ ト R E T 1 6 組 織 発 現 分 析

R E T 1 6 の 組 織 発 現 を 分 析 す る た め 、 多 組 織 c D N A パ ネ ル を C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s (パ ロ ア ル ト 、 カ リ フ ォ ル ニ ア) か ら 購 入 し 、 複 製 連 鎖 反 応 に 用 い た 。 簡 単 に 説 明 す る と 、 各 組 織 か ら の 1 . 0 μ l の c D N A を 以 下 の 試 薬 を 含 む 2 4 μ l の 反 応 混 合 物 に 加 え た : 0 . 4 μ M の 各 プ ラ イ マー 、 2 0 0 μ M の d N T P 、 1 × ア ド バ ン テー ジ ポ リ メ ラー ゼ 緩 衝 液 (C l o n t e c h) 、 お よ び 1 × ア ド バ ン テー ジ ポ リ メ ラー ゼ (C l o n t e c h) 。 プ ラ イ マー 配 列 は 、 J N F 2 3 2 (5 ' - G G C A G A T G C T A G T C T C A G G G - 3 ') (配 列 番 号 2 0) お よ び J N F 2 3 3 (5 ' - G G G A T T T A A C C T T G G T C C T G - 3 ') (配 列 番 号 2 1) で あ っ た 。 P C R 反 応 を 9 4 ° C で 3 0 秒 、 6 3 ° C で 3 0 秒 、 お よ び 7 2 ° C で 3 0 秒 の サ イ ク ル を 3 5 サ イ ク ル 行 っ た 。 P C R 産 物 を 2 . 0 % ア ガ ロ ー ス ゲ ル 上 の ゲ ル 電 気 泳 動 に よ り 分 離 し 、 D N A を 臭 化 エ チ ジ ウ ム 染 色 に よ り 視 覚 化 し た 。 発 現 の 結

10

20

30

40

50

果を図 11 に示す。

【0256】

実施例 4

HMVEC 細胞のトランスフェクション

トランスフェクションの前日に HMVEC 細胞を 3.5×10^5 細胞 / ウエルにて 6 ウエルプレートにプレATINGした。細胞を組織培養フラスコ中、37 °C にて 5% CO₂ でインキュベートした。この接種の結果、トランスフェクションの当日には 85 ~ 90% コンフルエントのウエルという結果となった。遠心分離はすべて 15 ml のポリスチレン管 (VWR、カタログ # 21008 - 212) かまたは 50 ml のポリスチレン管 (Costar -Corning、カタログ # 25339 - 50) で行った。OptiMEMI で 25 μg / ml に希釈することによりオリゴフェクチン G (Sequitur, Inc.、ナチック、マサチューセツツ) の 10 × ストックをまず調製した。ついで、OptiMEMI 1 ml 当たり 12.5 ml のオリゴフェクチン G を加えた。脂質の希釈ストックを室温で 15 分間静置した。

10

【0257】

OptiMEMI 1 ml 当たり 10 μl のオリゴマー (Sequitur, Inc.) を加えることにより、OptiMEMI 中の各オリゴマーの 10 × ストック (1 μM) を調製した。等容量のオリゴマーおよび脂質の 10 × 溶液を混合し、5 × 混合物とした。室温で 15 分間インキュベートすることにより、オリゴマーと脂質とで複合体を生成させた。ついで、オリゴマー / 脂質複合体を、5% FBS を含有する 4 容量の HMVEC 完全増殖培地 (Clonetics、サンジエゴ、カリフォルニアからの EGM プレット (bullet) キット培地) を加えることにより 1 × に希釈した。ついで、培地を細胞 (低継代数 HMVEC、Clonetics) から吸引し、適当なオリゴマー / 脂質複合体と置換した (6 ウエルプレートについて、1.5 ~ 2 ml のトランスフェクション培地をウエル当たり用いた)。

20

【0258】

細胞をトランスフェクション培地で 15 ~ 18 時間インキュベートした。ついで、TNF - α (R & D systems、ミネアポリス、ミネソタ) を直接、増殖培地に加えることにより、細胞を 10 ng / ml の TNF - α で 6 時間刺激した。オリゴマーの取り込みを、蛍光オリゴマーの取り込みにより顕微鏡で評価した。細胞の生存性を細胞死染色分析 (Sequitur, Inc.) により評価した。ついで、細胞を RNA 単離および TaqMan 分析のために回収した。

30

【0259】

実施例 5

RET16 遺伝子発現のアンチセンス抑制

この実施例では、アンチセンスオリゴヌクレオチド (オリゴマーまたは「オリゴ」) を用いて RET16 発現の抑制を決定する実験を行った。好ましいアンチセンスオリゴヌクレオチドはデオキシリボヌクレオチドベースまたはキメラデオキシリボヌクレオチド / リボヌクレオチドベースのものであり、以下に記載してある。オリゴヌクレオチドの合成は、米国特許第 5,849,902 号 (参照のためその全体を本明細書に引用する) に本質的に記載されている化学を用いて行った。

【0260】

アンチセンスオリゴマーは以下のとおりであった：

11587 : 5' - UGCACAUGCCGCCAAGGAGCCAUUCU - 3' (配列番号 16) および

11590 : 5' - GCACUUUACUACGCGUCCUAGAGA - 3' (配列番号 22)。11587 および 11590 アンチセンスオリゴヌクレオチドは、RET16 ポリヌクレオチド (配列番号 1) にハイブリダイズするのみならず、2 つの RET16 スプライス変異体ポリヌクレオチド、すなわち RET16.2 (配列番号 12) および RET16.3 (配列番号 14) にもハイブリダイズする。

40

【0261】

HMVEC 細胞を、2.5 μg / ml のオリゴフェクチン G と複合体を生成した 100 n

50

M (最終濃度) のアンチセンスオリゴマー (11587) または対照オリゴマー (11591: AGAGAUCUGACGCAUCAUUUCACG) (配列番号23) でトランスフェクションした。トランスフェクション開始の4時間後、実施例4に記載のようにトランスフェクション培地を細胞から吸引し、完全増殖培地で置換した。トランスフェクション開始の18時間後、細胞をTNF-アルファ (10 ng/ml) で6時間刺激した。刺激後、細胞をグアニジニウム緩衝液で溶解し、全RNAを溶解液から単離した。

【0262】

実施例 6

TNF- 刺激したHMVEC細胞: E-セレクチン発現のELISA検出

アンチセンスオリゴでトランスフェクションした細胞 (実施例5参照) を上記増殖条件 (実施例3参照) により24ウェルプレートで維持した。培地を交換することなく細胞を10 ng/mlのTNF-アルファで6時間処理した。

【0263】

処理期間の後、培地を除去し、プレートを4 PBS (Gibco BRL、グランドアイランド、ニューヨーク) で2回洗浄し、細胞をPBS中の0.5%グルタルアルデヒドで4に10分間固定した。ついで、プレートを穏やかに軽く叩いて固定溶液を除去し、20 mM EDTAを含むPBS中の3%ヤギ血清 (200 µl; ブロッキング緩衝液) を加えた。ついで、プレートを軽く叩き、ビオチン化抗E-セレクチン (R & D Systems、ミネアポリス、ミネソタ) をブロッキング緩衝液中に0.25 µg/mlにて37で1時間加えた。ウェルを冷PBSで4回洗浄した。ついで、ブロッキング緩衝液中の100 µl / ウェルのストレプトアビジンコンジュゲート西洋ワサビペルオキシダーゼ (1:4000希釈; Vector Labs SA-5004) を加え、ついで37で1時間インキュベートした。ついで、ウェルを冷PBSで4回洗浄した。

【0264】

ついで、100 µlのTMB発色試薬 (Sigma T8540) を加え、発色完了後、100 µlの1N H₂SO₄で反応を停止させた。発色試薬を96ウェルプレートに移した後、マルチウェルプレートリーダーでOD₄₅₀を読み取った。

【0265】

実施例 7

相補的ポリヌクレオチド

RET16タンパク質コード配列に相補的なアンチセンス分子または核酸配列、またはその部分を用い、天然のRET16の発現を低減または抑制させる。約15~35塩基対を含むアンチセンスまたは相補的オリゴヌクレオチドの使用を記載してあるが、本質的に同じ手順がより小さなまたは大きな核酸配列断片にも用いることができる。RET16タンパク質のコード配列に基づくオリゴヌクレオチド、たとえば図1および図4A、または配列番号1または配列番号3に示すものを用いて天然のRET16の発現を抑制する。相補的オリゴヌクレオチドは、典型的に最も独特の5'配列からデザインし、コード配列へのプロモーターの結合を妨害することにより転写を抑制するか、またはRET16タンパク質コード転写物へのリボソームの結合を妨害することにより翻訳を抑制するのに用いる。

【0266】

配列番号1または配列番号3のシグナルおよび5'配列の適当な部分を用い、有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、図2または図4に示すポリペプチドのシグナルまたは5'コード配列に翻訳する領域にまたがる約15~35ヌクレオチドのいずれかを含んでいる。適当なオリゴヌクレオチドのデザインは、OLIGO4.06ソフトウエアおよびRET16タンパク質コード配列 (配列番号1、配列番号3および配列番号5) を用いて行う。幾つかの目的のためには、マウスRET16核酸配列 (配列番号6) またはラットRET16核酸配列 (配列番号8) を用いることができる。

【0267】

実施例 8

ノーザン分析

10

20

30

40

50

ノーザン分析は遺伝子の転写物の存在を検出するのに用い、特定の細胞または組織型からのRNAを結合したメンブレンへの標識ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを含む (J. Sambrookら、上掲を参照)。BLAST (S. F. Altschul, 1993, J. Mol. Biol., 36: 290-300およびS. F. Altschulら、1990, J. Mol. Evol., 215: 403-410)を用いた類似のコンピューター法を用い、ジーンバンクやLIFESEQデータベース (Incyte Pharmaceuticals)などのヌクレオチドデータベース中の同一または関連する分子をサーチする。この分析は、複数のメンブレンベースのハイブリダイゼーションを行うものに比べて遥かに迅速で労力も少なくてすむ。さらに、コンピューターサーチの感度を変更して、特定のマッチングが正確な (同一の) または相同のものとして分類できるかを決定することができる。

10

【0268】

サーチの基礎はプロダクトスコア (product score) であり、以下の定義による: $(\% \text{配列同一性} \times \text{最大BLASTスコア}) / 100$ 。プロダクトスコアは、2つの配列間の類似性の程度および配列マッチングの長さの両者を考慮する。たとえば、40のプロダクトスコアではマッチングは1~2%の誤差内で正確であろう; 70のプロダクトスコアでは正確であろう。相同な分子は、通常、15~40のプロダクトスコアを示すものを選択することにより同定するが、より低いスコアも関連分子を同定することができる。ノーザン分析の結果は、RET16をコードする転写物が存在するライブラリーのリストとして報告される。存在量およびパーセント存在量も報告される。存在量はcDNAライブラリー中に示される特定の転写物の回数を直接反映しており、パーセント存在量は存在量をcDNAライブラリーで調べた配列の総数で除したものである。

20

【0269】

実施例9マイクロアレイ

マイクロアレイのためのオリゴヌクレオチドを生成するため、たとえば配列番号1または配列番号3をコンピューターアルゴリズム (ヌクレオチド配列の3'末端から開始する) を用いて調べる。アルゴリズムは、遺伝子に独特であり、ハイブリダイゼーションに適した範囲のGC含量を有し、ハイブリダイゼーションを妨害する予測された二次構造を欠く所定の長さのオリゴマーを同定する。アルゴリズムは、長さが20ヌクレオチドの特定のオリゴヌクレオチド、すなわち20-merを同定する。各配列の中央の1のヌクレオチドを変えたオリゴヌクレオチドのマッチングしたセットを生成する。このプロセスを各遺伝子についてマイクロアレイで繰返し、蛍光または放射性ヌクレオチドの存在下で20-merの二重のセットを合成し、基体の表面に配置する。基体がシリコンチップの場合は、光照射 (light-directed) 化学プロセスを沈着に用いる (WO95/11995、M. Cheeら、)。

30

【0270】

あるいは、化学カップリング法およびインクジェットデバイスを用いてオリゴマーを基体表面上に合成する (WO95/25116、J. D. Baldeschweilerら)。他の別法として、ドット (またはスロット) プロットと類似の「グリッド化 (gridded)」アレイを用い、たとえば真空システム、または熱、UV、機械的、または化学的な結合法を用いてcDNA断片またはオリゴヌクレオチドを基体表面上に配置および結合する。典型的なアレイは手で、または利用できる材料および装置を用いて製造することができ、8ドット、24ドット、96ドット、384ドット、1536ドット、または6144ドットのグリッドを含んでいてよい。ハイブリダイゼーション後、マイクロアレイを洗浄してハイブリダイズしていないプローブを除去し、検出デバイスを用いて放射能または蛍光のレベルおよびパターンを決定する。検出デバイスは、X線フィルムのように簡単なものであっても、光スキャニング装置のように複雑なものであってもよい。スキャニングした蛍光像を調べ、マイクロアレイ中の各オリゴヌクレオチド配列の相補性の程度および相対的な存在量/発現レベルを決定する。

40

【0271】

50

実施例 10特異的抗体を用いた天然のRET16タンパク質の精製

天然のまたは組換えのRET16ポリペプチドを、RET16ポリペプチドまたはそれ由来するペプチドに特異的な抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより実質的に精製する。イムノアフィニティークラムは、抗RET16ポリペプチド抗体を活性なクロマトグラフィー樹脂、たとえばCNBr活性化SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech) に共有結合させることにより構築する。結合後、製造業社の指示に従って樹脂をブロッキングし、洗浄する。

【0272】

RET16ポリペプチドを含む培地をイムノアフィニティークラムに通し、カラムをRET16ポリペプチドの優先的な吸着が可能な条件下（たとえば、界面活性剤の存在下の高いイオン強度の緩衝液）で洗浄する。カラムを抗体/RET16ポリペプチド結合を破壊する条件下（たとえば、pH2~3の緩衝液、または尿素やチオシアン酸イオンなどの高濃度のカオトロピック剤）で溶出し、RET16ポリペプチドを回収する。

【0273】

実施例 11RET16タンパク質と相互作用する分子の同定

RET16または生物学的に活性なその断片を¹²⁵I Bolton-Hunter試薬 (Boltonら、1973, Biochem. J., 133: 529) で標識する。マルチウエルプレートの内面に前もってアレイに並べた候補分子を標識RET16ポリペプチドとともにインキュベートし、洗浄し、標識RET16ポリペプチド-候補分子の複合体を有するウエルをアッセイする。濃度の異なるRET16ポリペプチドを用いて得たデータを用い、候補分子とRET16ポリペプチドとの数、親和性および結合の値を計算する。

【0274】

RET16ポリペプチドと相互作用するタンパク質、ペプチドまたは他の分子を同定するのに適した他の方法としては、本明細書に記載する酵母2ハイブリッド系などのリガンド結合アッセイが挙げられる。

【0275】

実施例 12

本発明のRET16.1、RET16.2またはRET16.3ポリペプチドに対応するN末端またはC末端欠失変異体の製造方法

本明細書に記載のように、本発明は、本発明のRET16.1、RET16.2またはRET16.3ポリペプチドに対応するN末端またはC末端欠失変異体 (N末端およびC末端欠失の組み合わせに加えて) の生成を包含する。そのような変異体を生成するために多くの方法が当業者に利用できる。そのような方法としては、PCR増幅と遺伝子クローニング法との組み合わせが挙げられる。分子生物学の当業者であれば、本明細書に提供するまたは言及する方法、および/または標準法として当該技術分野で知られた他の方法により、本発明の各欠失変異体を容易に生成できようが、以下に例示の方法を記載する。

【0276】

簡単に説明すると、完全長RET16.1、RET16.2、またはRET16.3ポリペプチド配列をコードする単離cDNAクローンをを用い、配列番号1、配列番号12、または配列番号14の所望の5'および3'位に由来する約15~25ヌクレオチドの適当なプライマーをデザインしてPCR増幅することができ、引き続き意図するN末端および/またはC末端欠失変異体をクローニングすることができる。そのようなプライマーは、たとえば、5'および3'プライマーのためにそれぞれ開始コドンおよび停止コドンを含んでいてよい。そのようなプライマーはまた、増幅後の欠失変異体のクローニングを容易にするために制限部位を含んでいてもよい。さらに、プライマーはまた、たとえばフラグ-タグ配列、コザック配列、または本明細書で検討および/または言及する他の配列などの付加的な配列を含んでいてよい。

【0277】

以下に代表的なPCR増幅条件を記載するが、当業者であれば効率的な増幅のために他の条件が必要であり、用いることができることを評価するであろう。100 μ lのPCR反応混合物を、10ngの鋳型DNA（すなわち、RET16.1、RET16.2、またはRET16.3のcDNAクローン）、200 μ Mの4dNTP、1 μ Mのプライマー、0.25UのTaq DNAポリメラーゼ（PE）、および標準Taq DNAポリメラーゼ緩衝液を用いて調製することができる。典型的なPCRサイクル条件は以下のとおりである：

20～25サイクル：45秒、93

2分、50

2分、72

1サイクル：10分、72

PCRの最後の伸長工程の後、5UのKlenow断片を加え、30で15分間インキュベートすることができる。

【0278】

断片をNotIおよびSalI制限酵素で消化後、同様に消化しておいた適当な発現および/またはクローニングベクター（たとえば、とりわけpSport1）に断片をクローニングすることができる。当業者であれば、他のプラスミドも同様に置換することができる、ある場合には望ましいことを評価するであろう。消化した断片およびベクターをDNALiガーゼを用いてライゲートし、ついで本明細書に記載したおよび/または当該技術分野で知られた方法を用いてコンピテントな大腸菌細胞を形質転換する。

【0279】

付加的なN末端欠失変異体を増幅するための5'プライマー配列は、下記式を参照して決定することができる：

$(S + (X * 3))$ から $((S + (X * 3)) + 25)$

[式中、「S」はRET16.1、RET16.2またはRET16.3遺伝子（すなわち、配列番号1、配列番号12、または配列番号14）の開始コドンの最初のヌクレオチド位置に等しく、「X」は意図するN末端欠失変異体の最もN末端側のアミノ酸に等しい]。第一の項は、配列番号1、配列番号12、または配列番号14のセンス鎖に対応する5'プライマーの開始5'ヌクレオチド位置を提供し、第二の項は5'プライマーの終了3'ヌクレオチド位置を提供する。プライマーの対応するヌクレオチド位置が決定されたら、たとえば配列の5'末端に適用可能な制限部位配列を付加することにより最終的なヌクレオチド配列を生成することができる。ここで記載したように、5'プライマーへの他の配列の付加は、ある場合には望ましいし、および/または用いることができる（たとえば、コザック配列など）。

【0280】

付加的なN末端欠失変異体を増幅するための3'プライマー配列は、下記式を参照して決定することができる：

$(S + (X * 3))$ から $((S + (X * 3)) - 25)$

[式中、「S」はRET16.1、RET16.2またはRET16.3遺伝子（配列番号1、配列番号12、または配列番号14）の開始コドンの最初のヌクレオチド位置に等しく、「X」は意図するN末端欠失変異体の最もC末端側のアミノ酸に等しい]。第一の項は、配列番号1、配列番号12、または配列番号14のアンチセンス鎖に対応する3'プライマーの開始5'ヌクレオチド位置を提供し、第二の項は3'プライマーの終了3'ヌクレオチド位置を提供する。プライマーの対応するヌクレオチド位置が決定されたら、たとえば配列の5'末端に適用可能な制限部位配列を付加することにより最終的なヌクレオチド配列を生成することができる。ここで記載したように、3'プライマーへの他の配列の付加は、ある場合には望ましいし、および/または用いることができる（たとえば、コザック配列など）。当業者であれば、PCR増幅を最適化するために上記ヌクレオチド位置の変更を使用できることを評価するであろう。

【0281】

10

20

30

40

50

本発明のC末端欠失変異体を増幅するための5'および3'プライマー配列を同定するに際して、上記の同じ一般式を用いることができる。さらに、本発明のN末端およびC末端欠失変異体の組み合わせを増幅するための5'および3'プライマー配列を同定するに際しても、上記の同じ一般式を用いることができる。当業者であれば、PCR増幅を最適化するために上記ヌクレオチド位置の改変を使用できることを評価するであろう。

【0282】

あるいは、本発明の好ましいポリペプチドは、たとえば、配列番号2、配列番号13、または配列番号15のRET16.1、RET16.2またはRET16.3ポリペプチドの内部領域に対応するポリペプチド配列（たとえば、NおよびCの両末端RET16.1、RET16.2、またはRET16.3ポリペプチド欠失の組み合わせ）を包含する。たとえば、内部領域は、式：アミノ酸NXからアミノ酸CX[ここでNXは、RET16.1、RET16.2、またはRET16.3（配列番号2、配列番号13、または配列番号15）のN末端欠失ポリペプチドアミノ酸であり、CXは、RET16.1、RET16.2、またはRET16.3（配列番号2、配列番号13、または配列番号15）のC末端欠失ポリペプチドアミノ酸である]により定義することができる。これらポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供される。本発明はまた、これらポリペプチドの本明細書に記載する免疫原および/または抗原性エピトープとしての使用をも包含する。

10

【0283】

本明細書に引用した全ての特許、特許出願、公開されたPCT出願および論説、書籍、参照文献、参照マニュアルおよび要約の内容は、本発明が関連する技術分野の状態を一層完全に記載するためにその全体を参照のため本明細書に引用する。

20

【0284】

上記に記載した主題には本発明の範囲および精神から逸脱することなく種々の改変をなすことができるので、上記の記載に含まれる、または添付の特許請求の範囲に定める主題は全て本発明を説明するにすぎないものと解釈されることを意図している。上記の教示に照らして本発明の多くの改変および変更が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0285】

【図1】図1は、予測されたヒトRET16転写物の完全長配列を含む、本発明のヒトRET16 DNAの1818bpポリヌクレオチド配列（配列番号1）を示す。図1の核酸配列（配列番号1）は、本明細書において配列番号3として示す1532bpのヒトRET16オープンリーディングフレームポリヌクレオチド配列（図4A）並びにさらなる3'および5'配列を含む。RET16のコード配列（CDS）は配列番号1のヌクレオチド148～ヌクレオチド1575に含まれる。

30

【0286】

【図2】図2は、配列番号1のポリヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列（配列番号2）を示す。RET16、すなわちRET16.1の予測される分子量は52.8キロダルトン（Kd）である。

【0287】

【図3】図3は、ヒトRET16ポリヌクレオチドコード配列（配列番号1）および1818bpのヒトRET16配列の導かれるアミノ酸配列（配列番号2）の両者を示す。図に示すように、コード配列は配列番号1のポリヌクレオチド配列のヌクレオチド位置番号148～150のATG（メチオニン）開始コドンから始まる。

40

【0288】

【図4】図4Aは、配列番号3のヒトRET16オープンリーディングフレーム（ORF）ポリヌクレオチド配列を示す。図4Bは、配列番号3のORFポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドのヒトRET16アミノ酸配列（配列番号4）を示す。図4Cは、ヒトRET16 cDNAの630塩基対の部分核酸配列（配列番号5）を示す。

【0289】

50

【図5】図5は、マウス由来のRET16ポリヌクレオチド配列、すなわちマウスRET16オーソログ（配列番号6）を示す。マウスRET16のコード配列（CDS）は、配列番号6のヌクレオチド19～ヌクレオチド1443に含まれる。

【0290】

【図6】図6は、マウスRET16 cDNAのポリヌクレオチド配列（配列番号6）によってコードされるマウスRET16ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号7）を示す。マウスRET16の予測された分子量は51.8Kdである。

【0291】

【図7】図7A～7Dは、RET16遺伝子に対応する部分cDNAでプローブした10日間の多組織ノーザン（MTN）を示す（実施例1Hを参照）。1.8kb転写物が幾つかの組織で検出された。図7Aは、ヒトMTNプロットの結果を示し、全ての組織でRET16転写物が種々のレベルで検出された。図7Aでは、発現は腎臓、膵臓および心臓で最も高く、胎盤、骨格筋および肝臓では一層低い発現レベルが観察され、肺および脳ではさらに低いレベルが観察された。図7Bは、ヒトMTNプロットIIの結果を示し、全ての組織でRET16転写物が種々のレベルで検出された。図7Bでは、発現は精巣で最も高く、卵巣、前立腺および膵臓では一層低い発現レベルが観察され、胸腺、小腸、結腸および末梢血白血球ではさらに低いレベルが観察された。図7Cは、ヒトMTNプロットIIIの結果を示し、殆どの組織でRET16転写物が検出された。図7Cでは、発現は甲状腺で最も高く、胃、脊髄、リンパ節、気管および副腎では一層低い発現レベルが観察された。RET16転写物は骨髄では実質的に検出できなかったが、より大きな約2.4kb転写物は骨髄で検出された。図7Dは、ヒト癌細胞株MTNプロットの結果を示し、幾つかの腫瘍株でRET16転写物が検出された。図7Dでは、発現はバーキットリンパ腫細胞株RAJIで最も高く、黒色腫細胞株G-361および慢性骨髄性白血病細胞株K-562では一層低い発現レベルが観察され、HeLa S3、リンパ芽球性白血病MOLT-4および結腸直腸腺癌SW480細胞株ではさらに低いレベルが観察された。前骨髄性白血病HL-60細胞株および肺癌腫A549細胞株では検出しうる発現は観察されなかった。

10

20

【0292】

【図8】図8は、アンチセンスオリゴマーを用いたRET16発現の抑制の結果を示す。図8に示してあるのは、GAPDH mRNA発現に正規化した後のRET16 mRNA発現のレベルである。各棒グラフは、3回のトランスフェクションの平均±標準偏差を示す。対照オリゴマー（76.6%）と比べてオリゴマー11587では強い抑制が観察された（実施例5参照）。

30

【0293】

【図9】図9は、アンチセンスE-セレクチンおよびアンチセンスRET16オリゴヌクレオチドのトランスフェクションによるE-セレクチンタンパク質発現の抑制がTNF刺激HMEC細胞に及ぼす影響を決定するために行った試験の結果を示す。細胞を、実施例6に記載するようにアンチセンスまたは対照のオリゴヌクレオチドでトランスフェクションした。ついで、細胞をTNF-アルファで6時間刺激し、E-セレクチンの細胞表面発現をELISAアッセイにより決定した（実施例6参照）。図9では、棒グラフはHMECの表面上でのE-セレクチンの相対発現を示す。

40

【0294】

【図10】図10A～図10Eは、ヒトRET16アミノ酸配列と他の既知のおよび新たに提供された配列との種々のアラインメントを示す。配列残基間の垂直の線はアミノ酸の同一を示す。配列残基間の2つの点はアミノ酸の類似を示す。配列残基間の1つの点はアミノ酸の非類似を示す。PileUpをSEQ-WEB GCG、Blosum62スコアリングマトリックス、ギャップ生成ペナルティ（gap creation penalty）8、およびギャップ伸長ペナルティ（gap extension penalty）2で行ってマルチプルシークエンスアラインメントを生成した。当業者には理解されるであろうように、PileUpはFengおよびDoolittle（1987, J. Mol. E

50

クエンズアラインメントを生成する。使用した方法はHigginsおよびSharpによって記載されたもの(1989, CABIOS, 5: 151-153)に似ている。特に、図10Aは、配列番号2または配列番号4からのヒトRET16アミノ酸配列の一部(上段)と*Podospira anserina*のHet-E-1アミノ酸配列の一部(配列の下段)との配列アラインメントを示す。het-e-1遺伝子によってコードされる*Podospira anserina*ベータトランスデュースン様タンパク質の刊行されたアミノ酸配列を配列番号10として提供してある。図10Bは、配列番号2または配列番号4からのヒトRET16アミノ酸配列の一部(上段)と*Thermomonospora curvata*のPKWAアミノ酸配列の一部(配列の下段)との配列アラインメントを示す。*Thermomonospora curvata* PKWA(pkwA)遺伝子(受託番号AF115313)の刊行されたアミノ酸配列を配列番号11として提供してある。図10Cは、ヒトRET16アミノ酸配列(配列番号2または配列番号4)(上段)とマウスRET16アミノ酸配列(配列番号7)(下段)との配列アラインメントを示す。図10Dは、ヒトRET16アミノ酸配列(配列番号2または配列番号4)(上段)とラットRET16アミノ酸配列(配列番号9)(下段)との配列アラインメントを示す。図10Eは、ヒトRET16アミノ酸配列(配列番号2または配列番号4)(上段)と*Podospira anserina*のHet-E-1アミノ酸配列(中段);および*Thermomonospora curvata*のPKWAアミノ酸配列(配列番号11)(配列の下段)とのマルチプルシークエンズアラインメントを示す。

10

【0295】

【図11】図11は、様々な組織採取源からのヒトRET16転写物の逆転写複製連鎖反応(RT-PCR)増幅を示す(実施例3)。

20

【0296】

【図12】図12は、ヒト(hu)RET16発現を示す電子ノーザンを示す。「クローンカウント」は列記した組織ライブラリー(Incyteデータベース)中のRET16クローンのランダムな分析でRET16配列が出現する回数を指しており、それによってRET16遺伝子が列記した組織で発現されたことが確認される。

【0297】

【図13】図13は、ラットから単離した部分RET16ポリヌクレオチド配列(配列番号8)、すなわちヒトRET16遺伝子のラットオーソログを示す。

【0298】

【図14】図14は、ラットRET16 cDNA配列のポリヌクレオチド配列(配列番号8;図13参照)によってコードされるラットRET16の部分ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号9)を示す。

30

【0299】

【図15】図15は、図10A~図10Eに記載したPileUpプログラムを用いた、ヒト(配列番号2または配列番号4)、マウス(配列番号7)およびラット(配列番号9)のRET16アミノ酸配列のマルチプルシークエンズアラインメントを示す。濃い陰影の部分は3つの全てのオーソログでの保存を示し、一方、薄い陰影の部分は2つのオーソログ間での保存を示す。ラットのRET16は部分的なポリペプチド配列のみであることに注意。ヒトRET16はマウスRET16(muRET16)と82.5%同一であり、部分的なラットRET16(rRET16)と92.9%同一である。muRET16は部分的なrRET16と98.5%同一である。

40

【0300】

【図16】図16は、RET16.1、RET16.2、RET16.3スプライス変異体ポリペプチド配列のマルチプルシークエンズアラインメントを示す。淡く陰影を付して囲んだ部分は、RET16.2で欠失しているアミノ酸(RET16.1の見当たらないエクソン5~8である)を示す。濃い陰影を付して囲んだ部分は、RET16.3には存在するが他のRET16配列には存在しないさらなるアミノ酸を示す。

【0301】

【図17】図17は、ヒトRET16(配列番号2または配列番号4)およびマウスRE

50

T 1 6 (配列番号 7) ポリペプチド配列中の W D ドメインおよび S A M ドメインのアライメントを示す。図示するように、淡い陰影の領域は W D リピートを示し、濃い陰影の領域は S A M ドメインを示す。同一の残基は囲んだ領域によって示してある。

【 0 3 0 2 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、ヒト R E T 1 6 (R E T 1 6 . 1 とも称する)、および R E T 1 6 . 2 および R E T 1 6 . 3 スプライス変異体のエクソン構造を示す。

【 0 3 0 3 】

【 図 1 9 】 図 1 9 A および 図 1 9 B は、ヒト R E T 1 6 . 2 スプライス変異体のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 2) およびコードされたアミノ酸配列 (配列番号 1 3) を示す (実施例 2)。ヒト R E T 1 6 . 2 のコード配列 (C D S) は、配列番号 1 2 のヌクレオチド 1 1 1 ~ ヌクレオチド 1 2 6 2 に含まれる。R E T 1 6 . 2 の予測された分子量は 4 2 . 7 K d である。

10

【 0 3 0 4 】

【 図 2 0 】 図 2 0 A および 図 2 0 B は、ヒト R E T 1 6 . 3 スプライス変異体のポリヌクレオチド配列 (配列番号 1 4) およびコードされたアミノ酸配列 (配列番号 1 5) を示す (実施例 2)。ヒト R E T 1 6 . 3 のコード配列 (C D S) は、配列番号 1 4 のヌクレオチド 1 3 6 ~ ヌクレオチド 1 6 4 1 に含まれる。R E T 1 6 . 3 の予測された分子量は 5 5 . 6 K d である。

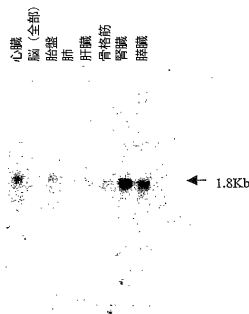
【 0 3 0 5 】

【 図 2 1 】 図 2 1 は、本発明の R E T 1 6 の U ボックスドメイン (配列番号 2 4) とタンパク質 P R P 1 9 の U ボックスドメイン (配列番号 2 5) とのコンセンサス残基のアライメントを示す。図 2 1 に示す保存されたコンセンサス残基の注釈は、Aravind および Koonin, 2002, Current Biology, 10(4): R132-R134 から改変してある。

20

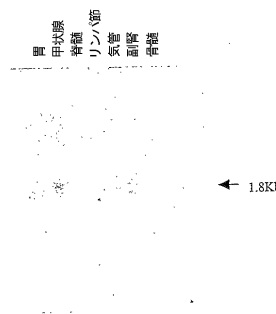
【 図 7 A 】

FIG. 7A



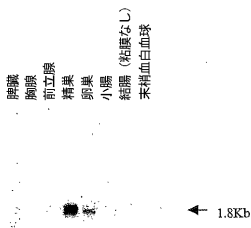
【 図 7 C 】

FIG. 7C



【 図 7 B 】

FIG. 7B



【 図 7 D 】

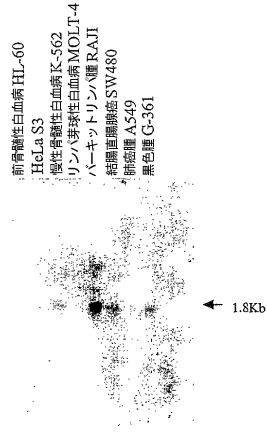


FIG. 7D

【 図 8 】

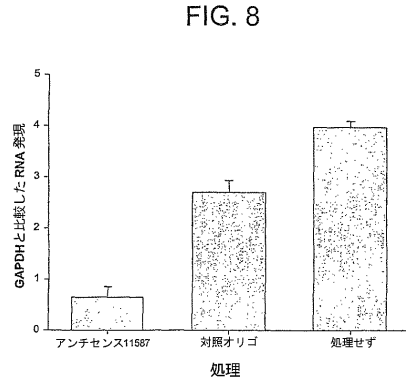


FIG. 8

【 図 9 】

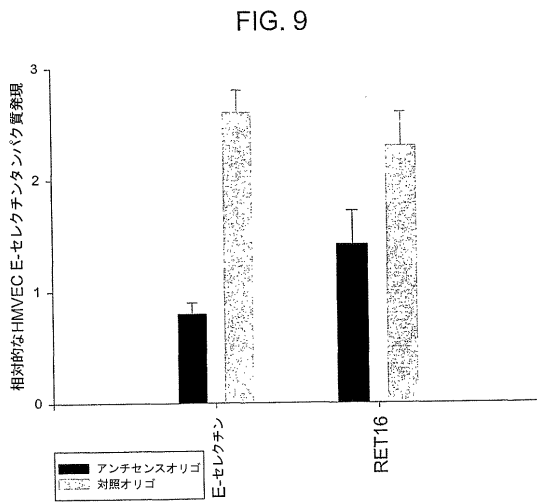


FIG. 9

【 図 11 】

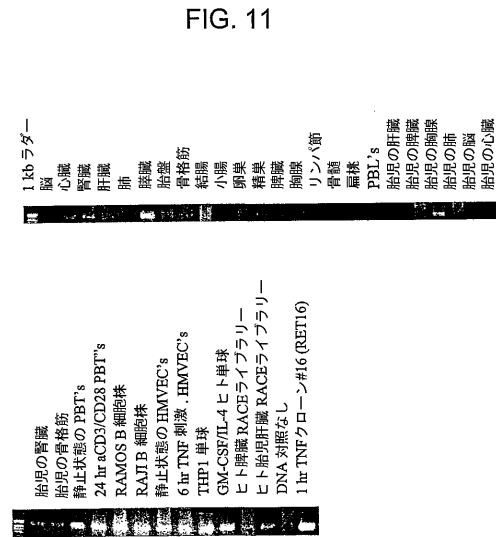


FIG. 11

【 図 1 2 】

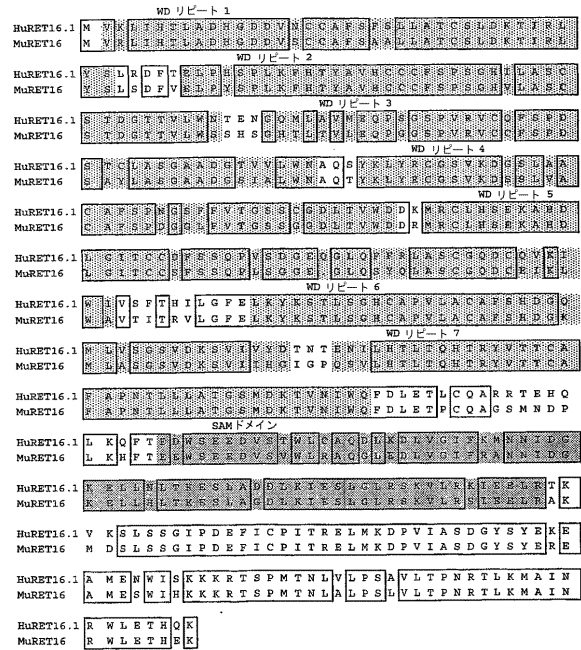
クローン
カウント

FIG. 12

腎臓、腎臓細胞 CA, 65M, m/KIDNTUT15
腎臓癌、明らかな細胞型癌、プール、SUB, CGAP
乳房、NF乳房癌患、35F
脳、前頭、ハンチントン、mw/CVA, 57M
前立腺癌、アデノCA, 66M, m/PROSDIN01
肺、mw/紡錘細胞カルチノイド、62F
脳、知覚-運動皮質、aw/CHF, 35M
肝臓/脾臓、胎児、20wM, NORM, CGAP/WMMWN
腎臓、プール、SUB, 3' CGAP
下垂体癌、腫瘍、プール、3', CGAP
前立腺、PIN, mw/癌、M, m/PROSTUP03, 3' CGAP
結腸、盲腸/下降、ポリポーシス、ポリリーブ、M/F、プール、NORM
食道癌、アデノCA, 61M, NORM
卵巣癌、乳頭漿液CA, 64F, WMMWN
気管支、上皮細胞、23M, 1/20% スモーク20 hr
T-Bリンパ球株、白血病、未定癌
バラガングリオン腫瘍、バラガングリオマ、aw/腎臓細胞CA, 46M
sm 小腸、回腸、脳、海馬、AD
脳、海馬、aw/大動脈瘤、45F, 5RP
卵巣、aw/平滑筋腫、43F
膀胱癌、TC CA, 72M
乳房、mw/ 脈管、アデノ CA, aw/結節mets, 46F, m/BRSTTUT15
胆嚢、胆嚢炎、胆石症、18F
前立腺、mw/ アデノCA, 68M, m/PROSTUT18
T-リンパ球、CD4+、プール、UCD3抗体
肺癌、mets 顆粒細胞癌、80F
乳房、PF変化、mw/ アデノCA, 45F, m/BRSTTUT08
CML 前駆細胞株、K-562, 55F, U5AZA 72 hr
肺癌、アデノCA, 47M
結腸、垂体、aw/平滑筋腫、37F
子宮、子宮筋層、mw/平滑筋腫、41F, NORM, m/UTRSTUT05
食道癌、アデノCA, 61M
結腸癌、アデノCA, 75M, m/COLNNOT01
脳、側頭、mw/ 感覚上皮癌、てんかん、45M
脳、髄質、aw/CHF, 35M
腎臓、49M
子宮、子宮内腫、F、プール
バラガングリオン癌、バラガングリオマ、aw/ 腎臓細胞 CA, 46M
前立腺、AH, mw/アデノCA、結節 mets、55M, Ig/N,
m/PROSTUT16
脳、神経原性癌細胞株、SK-N-MC、ニューロロビセリナーマ、14F
副腎癌、褐色細胞腫、57F
脳、線条/淡室球/核殻、aw/CHF, 81F, RP
骨髄、脛骨、aw/mets 骨髄核筋肉腫 SAR, 16M
甲状腺、リンパ球性甲状腺炎、mw/乳頭 CA, 30F
乳房、mw/ 脈管 CA, CAインシトウ、aw/ 結節 mets, 62F
肝臓癌、mets 神経内分泌 CA, 62F, m/ LVRTMR01
umb 索血液、単核球、VIL-5
子宮癌、漿液乳頭 CA, F、プール、3' CGAP
肺、胎児、19w, NORM, CGAP/WMMWN
胎盤、新生児、F, NORM, WM
子宮、F, NORM, CGAP/WMMWN
膀胱癌、アデノCA, 3' CGAP
脳、小児、10wF, NORM, WM
精巣、M, NORM, CGAP/WN
肝臓/脾臓、胎児、20wM, NORM, WM
組織の混合、胎児の肺、精巣、B-細胞、SUB, 3' CGAP/WN

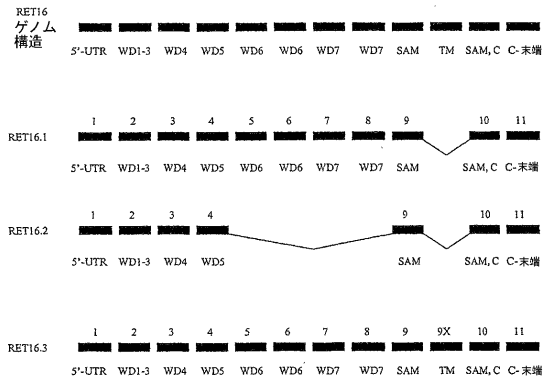
【 図 1 7 】

FIG. 17



【 図 1 8 】

FIG. 18



【 図 2 1 】

FIG. 21

b (L1YFWV6(A)) 繰り返し
i (L1VA4) 挿入
s (GASNSTCP) 小さい
p (STVREQHD) 繰り返し
(-) (D,F) 真に荷電

U ボックス 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
RET16 U マックス E F I C P I T R E L M K D P V I A S D G Y S Y E K E A M E N W I S K K K R T S P M T N L V L P S A V
PRP19 M L C A I S G K V P R R P V L S P K S R T I F E K S L L E Q Y V K D T G N D P I T N E P L S I E E I V
コンセンサス h s i p h h (j) s h s n p p i p h s p s

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau



(43) International Publication Date 29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number WO 02/066494 A2

(51) International Patent Classification: C07K

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): TODDERUD, C., Gordon [US/US]; 56 Autumn Drive, Newtown, PA 18940 (US). FINGER, Joshua, N. [US/US]; Apartment 254, 222 Woodland Parkway, San Marcos, CA 92069 (US). RILLEMA, Jill [US/US]; 18C Evert Court, Princeton, NJ 08540 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/05162

(22) International Filing Date: 15 February 2002 (15.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/269,366 16 February 2001 (16.02.2001) US; 60/294,181 29 May 2001 (29.05.2001) US

(74) Agent: KLEIN, Christopher, A.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Lawrenceville-Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US], P.O. Box 4000, Lawrenceville-Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (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 (only in whole), DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,

[Continued on next page]

(54) Title: IDENTIFICATION AND CLONING OF A NOVEL HUMAN GENE, RET16, INVOLVED IN THE INTRACELLULAR SIGNALING CASCADE



WO 02/066494 A2

1 gctgttccc totgtctgg gctctggcg gggccccc cggcagctc
51 acctggcgg caagtgacc gaccgccc tgggaacct gaaggcggat
101 ccggggccc ccggccctg caggctgtt tcttcaat aaagaacatg
151 gtgaactga tcaacactt agtgcactt ggtgacag tcaactggg
201 tgccttctc tttctctct tggctactt ctcttggac aaacaatc
251 gctgtactc gtaactgac ttaactgac tggcaactc tccactgag
301 ttctaacct atgtatcca ctgctgtgt tctccctct caggacatac
351 ttggcactg gttcaaacg atggtacac tgcctatgg aaactggac
401 atggacagt gctggcgtg atggaacag ctatggagc cctgtgagg
451 gttggcagt tttcccaga ctccactgt ttggcactg gggcagctga
501 tggactgtg gttctggga agcaacact atcaacta catagatgt
551 gtgtgttaa agatgctcc ttggcagat gtcgatttc tctaaagga
601 agctctctt tcaactgct ctcactggt gatttaacg tgggatga
651 taactgagg tgcctgaca gtaaaaagg acatgatct ggaactacc
701 gctggattt tctctcaag cagttcttg atggaaaa aggtctcag
751 tttttctgc tggctaatg tggcagat tggcaactc aaatttggc
801 tgtttcttt accatattt taggtttga attaaatat aaagtacac
851 tgggtggca ctgtgctct gttctgctt gctcttct ccatgatgg
901 cagatgtag tctcaggtc agggatag tctgatag tatagatcac
951 taactgtag aatatactt acactgac taagacac agtatgta
1001 caactgtgc ttttgaact aataccttt tactgtac tggtaaat
1051 gacaaaacg tgaactctg ccaatttga ctggaacac ttggcaagg
1101 aagggtaca gaactctc tgaactatt taaggagat tggcagagg
1151 aggtgtctc aactgctt tgtgcaag attaaaaga tctgttctt
1201 atttcaaga tgaataact tgaatgaaa gaactgtga atctacaaa
1251 agaaactct gctgatgat tgaatacga atctctaga atgctgata
1301 agatgtag gaaactgga ggtctcaga ccaagttaa atctctct
1351 tcaagaaat ctgatgatt tatatgcca ataactag acctatgaa
1401 agatcggtc atgcaatg atgctatc atagaaag gaagcaatg
1451 aaactggat cagaaatag aaactgaca gttccatgac aaactctgt
1501 ctctctcag cggacttcc accaatagg atctgaaa tggcctcga
1551 tagatggctg gagacacac aaaaataaa ttgtgtgat tgaattatt
1601 atatttctg tgatctatt tgaatgatt atagtaaa actaatoga
1651 cactactaaa agcaaacag gaaaaggta aactcttaa attagttac
1701 atataaaa tctctctt cttctttaa aaacactg gactactat
1751 aaagccttt ctgactgt gaaaagatc ttcagata tgaataaaa
1801 gttacttt aaaaaaa

(57) Abstract: The present invention describes a newly discovered polynucleotide encoding a protein involved in the cell signaling cascade, called RET16, cloned, isolated and identified from TNF-alpha stimulated human microvascular endothelial cells, as well as mouse and rat RET16 orthologs thereof. Also described are the RET16 polypeptide sequence, expression vectors, host cells, agonists, antagonists, antisense molecules, and antibodies related to the polynucleotide and/or polypeptide of the present invention. Methods for screening for modulators, particularly inhibitors, of the human RET16 protein, and use of the RET16 polynucleotide and polypeptide for therapeutics and diagnostics are described.

WO 02/066494 A2 

RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Published:

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

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

- 1 -

Docket No.: D0031PC

Identification and Cloning of a Novel Human Gene, RET16, Involved in the Intracellular Signaling Cascade

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the identification and cloning of a novel full-length human RET16 gene and its encoded polypeptide product, which is expressed in TNF-stimulated human lung microvascular endothelial cells. The invention further relates to orthologs of RET16 and the putative role of the RET16 polynucleotide sequence and its encoded product as a cell signaling molecule in the intracellular signaling cascade. The present invention also relates to uses of the RET16 polynucleotide, polypeptide and modulators thereof in therapeutics and methods involving inflammation and inflammatory diseases, conditions, or disorders and/or involving diseases associated with uncontrolled cell growth, such as cancers, tumors, neoplasms and the like.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The development of inflammatory disease is characterized by infiltration of circulating blood cells, e.g., leukocytes, across the endothelium into the tissue. A number of key events occur in the endothelial cells that mediate this "gateway" function. The endothelial cells express receptors and chemokines that sequentially tether the leukocytes, activate them, cause them to tightly adhere, and extravasate between the endothelial cell junctions. This process is initiated by the production of early inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF).

The coordinated stimulation of expression of this series of receptors and chemokines is mediated by intracellular signaling molecules, including transcription factors, kinases and scaffolding proteins. These signaling molecules form a signaling cascade that can be a "master switch" for the development of inflammatory processes. Components of this cascade, such as NF- κ B, are known. The analysis of genes that are differentially

30

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 2 -

expressed in TNF-activated endothelium can help to identify components of the above-described "master switch" cascade.

The present invention provides the RET16 gene expressed in TNF-alpha-activated human endothelial cells, whose encoded product is regarded to function as a cell signaling molecule involved in the cell signaling cascade. Molecules which play a role in the cell signaling cascade are involved in cellular responses to inflammatory agents, such as cytokines, lymphokines, chemokines, leukotrienes and the like. Further, as a candidate cell signaling protein involved in the cell signaling cascade, RET16 is regarded to be involved in a variety of cell growth-related diseases or disorders.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a newly discovered human gene and its encoded product, called RET16, which was found to be expressed in human microvascular endothelial cells that had been stimulated with TNF-alpha. According to the present invention, RET16 is a cytoplasmic protein having activity as a cell signaling protein.

One aspect of the invention provides the RET16 polynucleotide sequence as depicted in SEQ ID NO:1. The present invention also provides a polynucleotide sequence comprising the complement of SEQ ID NO:1, or variants thereof. In addition, the present invention features polynucleotide sequences which hybridize under moderate or high stringency conditions to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1.

Another aspect of the invention provides the RET16 polypeptide, encoded by the polynucleotide of SEQ ID NO:1 and having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a functional or biologically active portion thereof. In accordance with the present invention, an isolated, substantially purified RET16 protein is provided.

Yet another aspect of the present invention provides an isolated polynucleotide sequence (1532 bp) of the human RET16 open reading frame cDNA (SEQ ID NO:3) and the polypeptide sequence encoded by the

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 3 -

open reading frame human RET16 and having the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:4, or a functional or biologically active portion thereof. An isolated, substantially purified RET16 protein or polypeptide, e.g., SEQ ID NO:4, is provided. Also in accordance with the present invention, the 1532 bp human RET16 (also called RET16.1) open reading frame polynucleotide sequence cloned into a vector has been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on March 7, 2001 under ATCC Accession No. PTA-3161 according to the terms of the Budapest Treaty. Vectors containing the cloned RET16 variant cDNAs, i.e., RET16.2 and RET16.3, have also been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on March 7, 2001 under ATCC Accession No. PTA-3161 according to the terms of the Budapest Treaty. Accordingly, the present invention provides a RET16 cDNA nucleic acid sequence comprising ATCC Deposit Accession No. PTA-3161.

A further aspect of the present invention provides a polynucleotide sequence comprising the complement of SEQ ID NO:3, or variants thereof. In addition, the present invention features polynucleotide sequences which hybridize under moderate or high stringency conditions to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3. In addition, a 630 bp partial nucleic acid sequence of human RET16 (SEQ ID NO:5) is provided.

Another aspect of the present invention provides variants of RET16. In accordance with the invention, an isolated RET16.2 variant polynucleotide (SEQ ID NO:12) and its encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:13) are provided. In addition, an isolated RET16.3 variant polynucleotide (SEQ ID NO:14) and its encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:15) are provided. Portions or fragments, preferably functional or biologically active portions or fragments of these sequences are also provided.

An additional feature of the invention provides mouse and rat orthologs of the human RET16 protein. According to the invention, SEQ ID NO:6 depicts the polynucleotide sequence of the mouse RET16 ortholog.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 4 -

SEQ ID NO:7 depicts the amino acid sequence of the mouse RET16 polypeptide ortholog encoded by SEQ ID NO:6. SEQ ID NO:8 depicts a partial polynucleotide sequence of the rat RET16 ortholog; and SEQ ID NO:9 depicts the amino acid sequence of the partial polypeptide sequence of the rat RET16 ortholog encoded by SEQ ID NO:8.

Another feature of the invention is to provide compositions comprising the RET16 polynucleotide sequence, preferably human RET16, or a fragment thereof, or the encoded RET16 polypeptide, or a fragment or portion thereof. Also provided by the present invention are pharmaceutical compositions comprising at least one RET16 polypeptide, or a functional portion thereof, wherein the compositions further comprise a pharmaceutically acceptable vehicle, e.g., a carrier, excipient, or diluent.

Yet another aspect of the present invention provides N-terminal, C-terminal, or internal deletion polypeptides of the encoded RET16 polypeptides and compositions comprising these deletion polypeptides. Polynucleotides encoding these deletion polypeptides are also provided. The use of the deletion polypeptides as immunogenic and/or antigenic epitopes is described further herein.

A further aspect of the present invention provides the polynucleotide sequences of RET16.1, RET16.2, RET16.3 and the RET16 mouse ortholog lacking the initiating start codon, in addition to the resulting encoded polypeptides of RET16.1, RET16.2, RET16.3 and mouse RET16. More specifically, polynucleotide corresponding to nucleotides 151 through 1575 of SEQ ID NO:1, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 476 of SEQ ID NO:2 are provided; the polynucleotide corresponding to nucleotides 114 through 1262 of SEQ ID NO:12, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 384 of SEQ ID NO:13 are provided; the polynucleotide corresponding to nucleotides 139 through 1641 of SEQ ID NO:14, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 502 of SEQ ID NO:15 are provided; and the polynucleotide corresponding to nucleotides 19 through 1443 of SEQ ID NO:6, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 475 of SEQ ID NO:7. Also provided

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 5 -

are recombinant vectors comprising the RET16.1, RET16.2, RET16.3 and mouse RET16 encoding sequences, and host cells comprising the vectors as described herein.

Another aspect of the invention provides an antisense of the RET16
5 nucleic acid sequence, preferably, an antisense to the human RET16 nucleic acid sequence, as well as oligonucleotides, fragments, or portions of the RET16 nucleic acid molecule or antisense molecule. Also provided are expression vectors and host cells comprising polynucleotides that encode the human RET16 polypeptide, or portions or fragments thereof.

10 Yet another aspect of the invention provides methods for producing a polypeptide comprising the amino acid sequence depicted in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, or a fragment thereof, comprising the steps of a) cultivating a host cell containing an expression vector containing at least a functional fragment of the polynucleotide sequence encoding the human RET16
15 polypeptide according to this invention under conditions suitable for the expression of the polynucleotide; and b) recovering the polypeptide from the host cell.

A further feature of the invention provides antibodies, and binding
20 fragments thereof, which bind specifically to the RET16 polypeptide, or an epitope thereof, for use as therapeutics and diagnostic agents.

Yet another feature of the invention provides methods for screening
for agents or molecules which bind to and/or modulate the RET16
polypeptide, preferably human RET16 polypeptide, e.g., inhibitors, other
intracellular signaling molecules and antagonists, as well as modulators,
25 particularly, inhibitors and antagonists, particularly those that are obtained from the screening methods described. Also provided are methods to screen for inhibitors or activators of the interaction, e.g., a binding interaction, of the RET16 protein with one or more other cell signaling proteins.

30 Another aspect of the invention provides a substantially purified antagonist or inhibitor of the RET16 polypeptides of the invention, e.g., SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15. In this regard,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 6 -

and by way of a nonlimiting example, a purified antibody that binds to a polypeptide comprising all or an immunogenic and/or antigenic portion of the amino acid sequence of the RET16 polypeptides of the invention, e.g., SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15 is provided.

5 Yet another aspect of the invention provides a substantially purified agonist or activator of the RET16 polypeptides of the invention, e.g., SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15.

A further aspect of the invention provides RET16 nucleic acid sequences, polypeptides, peptides and antibodies for use in the diagnosis
10 and/or screening of disorders or diseases associated with expression of the RET16 polynucleotide and its encoded polypeptide involved in the cell signaling cascade as described herein (e.g., see FIG. 9).

Another aspect of the invention provides RET16 probes or primers for
15 detecting RET16-related diseases and/or for monitoring a patient's response to therapy or treatments of RET16-associated diseases or disorders. The probe or primer sequences comprise nucleic acid or amino acid sequences of RET16 as described herein.

Another feature of the invention provides kits for screening and
20 diagnosis of disorders associated with aberrant or uncontrolled cellular expression of the RET16 polynucleotide and its encoded polypeptide as described herein. Such kits can be employed for the determination of the nucleotide sequences of human RET16 alleles. The kits can comprise reagents and instructions for amplification-based assays, nucleic acid probe assays, protein nucleic acid probe assays, antibody assays, or any
25 combination thereof.

In another of its aspects, the invention provides a method for
detecting a polynucleotide that encodes the RET16 polypeptide in a
biological sample comprising the steps of: a) hybridizing the complement of
the polynucleotide sequence encoding SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 to a
30 nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and b) detecting the hybridization complex, wherein the presence of the complex correlates with the presence of a polynucleotide encoding

- 7 -

the RET16 polypeptide in the biological sample. The nucleic acid material can be further amplified by the polymerase chain reaction prior to hybridization.

Yet another aspect of this invention provides methods for detecting genetic predisposition, susceptibility and/or response to treatment or therapy of various RET16-associated diseases, disorders, or conditions, as described further herein.

Further aspects, features and advantages of the present invention will be better understood upon a reading of the detailed description of the invention when considered in connection with the accompanying figures/drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 presents an 1818 bp polynucleotide sequence of human RET16 DNA of the present invention (SEQ ID NO:1), which comprises the full length sequence of the predicted human RET16 transcript. The **FIG. 1** nucleic acid sequence (SEQ ID NO:1) comprises the 1532 bp human RET16 open reading frame polynucleotide sequence presented herein as SEQ ID NO:3, (**FIG. 4A**), as well as additional 3' and 5' sequence. The coding sequence (CDS) of RET16 is encompassed by nucleotide 148 to nucleotide 1575 of SEQ ID NO:1.

FIG. 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1. The predicted molecular weight of RET16, i.e., RET16.1, is 52.8 kilodaltons (Kd).

FIG. 3 presents both the human RET16 polynucleotide coding sequence (SEQ ID NO:1) and the deduced amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of the 1818 bp human RET16 sequence. As shown, the coding sequence begins at the ATG (methionine) codon at nucleotide position numbers 148-150 of the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1.

FIG. 4A shows the human RET16 open reading frame (ORF) polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3. **FIG. 4B** shows the human RET16 amino acid sequence of the polypeptide (SEQ ID NO:4) encoded

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 8 -

by the ORF polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3. **FIG. 4C** presents the 630 base pair partial nucleic acid sequence of human RET16 cDNA (SEQ ID NO:5).

5 **FIG. 5** shows the RET16 polynucleotide sequence derived from mouse, i.e., the murine RET16 ortholog, (SEQ ID NO:6). The coding sequence (CDS) of murine RET16 is encompassed by nucleotide 19 to nucleotide 1443 of SEQ ID NO:6.

10 **FIG. 6** shows the amino acid sequence of the murine RET16 polypeptide (SEQ ID NO:7) encoded by the polynucleotide sequence of murine RET16 cDNA (SEQ ID NO:6). The predicted molecular weight of mouse RET16 is 51.8 Kd.

FIGS. 7A-7D show 10 day multiple tissue Northern (MTNs) probed with the partial cDNA corresponding to the RET16 gene. (See Example 1H). A 1.8 kb transcript was detected in several tissues. **FIG. 7A** presents the results of a human MTN blot in which RET16 transcript was detectable in all tissues, at varying levels. In **FIG. 7A**, expression was highest in kidney, pancreas and heart, with lower expression levels observed in the placenta, skeletal muscle and liver, and even lower levels in lung and brain. **FIG. 7B** presents the results of a human MTN blot II, in which RET16 transcript was detectable in all tissues, at varying levels. In **FIG. 7B**, expression was highest in the testis, with lower expression levels in ovary, prostate, and spleen, and even lower levels in thymus, small intestine, colon and peripheral blood leukocytes. **FIG. 7C** presents the results of a human MTN blot III, in which RET16 transcript was detectable in most tissues. In **FIG. 7C**, expression was highest in the thyroid, with lower levels observed in stomach, spinal cord, lymph node, trachea, and adrenal gland. RET16 transcript was virtually undetectable in the bone marrow, although a larger approximately 2.4 kb transcript was detected in bone marrow. **FIG. 7D** presents the results of a human cancer cell line MTN blot, in which RET16 transcript was detectable in several tumor lines. In **FIG. 7D**, expression was highest in the Burkitt's lymphoma cell line RAJ1, with lower levels observed in the melanoma cell line G-361 and the chronic myelogenous leukemia cell

- 9 -

line K-562, and with even lower levels found in HeLa S3, lymphoblastic leukemia MOLT-4, and colorectal adenocarcinoma SW480 cell lines. No detectable expression was observed in the promyelocytic leukemia HL-60 cell line and in the lung carcinoma A549 cell line.

5 **FIG. 8** presents the results of the inhibition of RET16 expression using an antisense oligomer. Shown in **FIG. 8** are the levels of RET16 mRNA expression after normalization to GAPDH mRNA expression. Each bar represents the average +/- standard deviation of triplicate transfections. Strong inhibition was observed with oligomer 11587, compared with the
10 control oligomer (76.6%). (See Example 5).

FIG. 9 presents the results of studies performed to determine the inhibition of E-selectin protein expression on TNF-stimulated HMVEC cells by transfection of antisense E-selectin and antisense RET16
oligonucleotides. The cells were transfected with the antisense or control
15 oligonucleotides as described in Example 6. The cells were then stimulated for six hours with TNF-alpha and the cell surface expression of E-selectin was determined by an ELISA assay. (See Example 6). In **FIG. 9**, the bars represent the relative expression of E-selectin on the surface of HVEC.

FIGS. 10A-10E show various alignments of the human RET16 amino
20 acid sequence with other known and newly-provided sequences. The vertical lines between the sequence residues indicate amino acid identity. Two dots between sequence residues indicate amino acid similarity. One dot between sequence residues indicates amino acid dissimilarity. PileUp was used to generate a multiple sequence alignment on SEQ-WEB GCG,
25 the Blossum62 scoring matrix, gap creation penalty of 8, and gap extension penalty of 2. As will be understood by the skilled practitioner, PileUp creates a multiple sequence alignment using a simplification of the progressive alignment method of Feng and Doolittle (1987, *J. Mol. Evol.*, 25:351-360). The method used is similar to that described by Higgins and Sharp (1989,
30 *CABIOS*, 5:151-153).

 Specifically, **FIG. 10A** presents a sequence alignment of a portion of the human RET16 amino acid sequence from SEQ ID NO:2 or SEQ ID

- 10 -

NO:4, (top line) with a portion of the Het-E-1 amino acid sequence of *Podospira anserina* (bottom line of sequence). The published amino acid sequence of *Podospira anserina* beta transducin-like protein encoded by the het-e-1 gene (Accession Number L28125) is provided as SEQ ID NO:10.

5 **FIG. 10B** presents a sequence alignment of a portion of the human RET16 amino acid sequence from SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, (top line), with a portion of the PKWA amino acid sequence of *Thermomonospora curvata* (bottom line of sequence). The published amino acid sequence of *Thermomonospora curvata* PKWA (pkwA) gene (Accession Number

10 AF115313) is provided as SEQ ID NO:11. **FIG. 10C** presents a sequence alignment of the human RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4), top line, with the murine RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:7), bottom line. **FIG. 10D** presents a sequence alignment of human RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4), top line, with

15 rat RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:9), bottom line. **FIG. 10E** presents a multiple sequence alignment of human RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4), (top line) with the Het-E-1 amino acid sequence of *Podospira anserina* (SEQ ID NO:10), (middle line); and the PKWA amino acid sequence of *Thermomonospora curvata* (SEQ ID

20 NO:11), (bottom line of sequence).

FIG. 11 shows reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of the human RET16 transcript from a variety of tissue sources (Example 3).

FIG. 12 shows an electronic Northern depicting human (hu) RET16 expression. "Clone count" refers to the number of times that the RET16 sequence appeared in a random analysis of the RET16 clone in the listed tissue libraries (Incyte database), thereby confirming that the RET16 gene is expressed in the listed tissue.

25

FIG. 13 shows the partial RET16 polynucleotide sequence isolated from rat (SEQ ID NO:8), i.e., the rat ortholog of the human RET16 gene.

30

- 11 -

FIG. 14 shows the amino acid sequence of the rat RET16 partial polypeptide (SEQ ID NO:9) encoded by the polynucleotide sequence of the rat RET16 partial cDNA sequence (SEQ ID NO:8; **FIG. 13**).

FIG. 15 shows a multiple sequence alignment of human (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4), mouse (SEQ ID NO:7) and rat (SEQ ID NO:9) RET16 amino acid sequences using the PileUp program described for **FIGS. 10A-10E**. Dark highlights indicate conservation among all three orthologs, while the lighter highlights indicate conservation between two of the orthologs. Note that the rat RET16 is only a partial polypeptide sequence.

Human RET16 is 82.5% identical to mouse RET16 (muRET16) and 92.9% identical to partial rat RET16 (rRET16). MuRET16 is 98.5% identical to partial rRET16.

FIG. 16 shows a multiple sequence alignment of the RET16.1, RET16.2, RET16.3 splice variant polypeptide sequences. The lightly shaded boxes designate amino acids deleted in RET16.2, which is missing exons 5-8 of RET16.1. Darker shaded boxes designate the additional amino acids present in RET16.3 that are not present in the other RET16 sequences.

FIG. 17 shows an alignment of WD and SAM domains in the human RET16 (SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4) and murine RET16 (SEQ ID NO:7) polypeptide sequences. The lightly shaded regions indicate the WD repeats and the darker shaded region designates the SAM domain as indicated in the figure. Identical residues are indicated by the boxed regions.

FIG. 18 shows the exon structures of human RET16 (also called RET16.1 herein), and the RET16.2 and RET16.3 splice variants.

FIGS. 19A and 19B show the human RET16.2 splice variant polynucleotide sequence (SEQ ID NO:12) and encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:13), (Example 2). The coding sequence (CDS) of human RET16.2 is encompassed by nucleotide 111 to nucleotide 1262 of SEQ ID NO:12. The predicted molecular weight of RET16.2 is 42.7 Kd.

FIGS. 20A and 20B show the human RET16.3 splice variant polynucleotide sequence (SEQ ID NO:14) and encoded amino acid

- 12 -

sequence (SEQ ID NO:15), (Example 2). The coding sequence (CDS) of human RET16.3 is encompassed by nucleotide 136 to nucleotide 1641 of SEQ ID NO:14. The predicted molecular weight of RET16.3 is 55.6 Kd.

5 **FIG. 21** shows an alignment of the consensus residues of the U box domain of the RET16 protein (SEQ ID NO:24) of the present invention and the U box domain of protein PRP19 (SEQ ID NO:25). The annotation of the conserved consensus residues shown in FIG. 21 is modified from Aravind and Koonin, 2002, *Current Biology*, 10(4):R132-R134.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

10 The following definitions are provided to more fully describe the present invention in its various aspects. The definitions are intended to be useful for guidance and elucidation, and are not intended to limit the disclosed invention and its embodiments.

Definitions

15 The RET16 polypeptide (or protein) refers to the amino acid sequence of isolated and preferably substantially purified RET16 protein, which, although isolated from a human cDNA library source according to the present invention, can be obtained from any species, preferably mammalian, including mouse, rat, non-human primates, and more preferably, human;
20 and from a variety of sources, including natural, synthetic, semi-synthetic, or recombinant. Indeed, the present invention more particularly provides (i) a human RET16 polynucleotide sequence of the full-length human RET16 transcript (SEQ ID NO:1) and the encoded human RET16 polypeptide sequence (SEQ ID NO:2), (FIGS. 1-3); (ii) the human RET16 open reading
25 frame polynucleotide sequence (SEQ ID NO:3) and the encoded human RET16 polypeptide sequence (SEQ ID NO:4); (iii) the murine RET16 polynucleotide sequence (SEQ ID NO:6) and the encoded murine RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:7), (FIGS. 5 and 6), and (iv) a partial nucleic acid sequence of the rat RET16 ortholog (SEQ ID NO:8) and the
30 encoded rat RET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:9), (FIGS. 13-14).

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 13 -

Functional fragments and portions of the RET16 polynucleotides and polypeptides described herein are also embraced by the present invention.

An agonist (e.g., activator) refers to a molecule which, when bound to the RET16 polypeptide, or a functional fragment thereof, increases or
5 prolongs the duration of the effect of the RET16 polypeptide. Agonists can include proteins, nucleic acids, carbohydrates, or any other molecules that bind to and modulate the effect of RET16 polypeptide. An antagonist (e.g., inhibitor) refers to a molecule which, when bound to the RET16 polypeptide, or a functional fragment thereof, decreases or eliminates the amount or
10 duration of the biological or immunological activity of RET16 polypeptide. Antagonists can include proteins, nucleic acids, carbohydrates, antibodies, or any other molecules that decrease, reduce or eliminate the effect and/or function of the RET16 polypeptide.

"Nucleic acid sequence", as used herein, refers to an oligonucleotide,
15 nucleotide, or polynucleotide (e.g., cDNA, DNA, RNA), and fragments or portions thereof, and to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which can be single- or double-stranded, and represent the sense or antisense strand. By way of nonlimiting example, fragments include nucleic acid sequences that are greater than about 10-60 nucleotides in length,
20 preferably about 20-60 nucleotides, and also preferably include fragments that are at least 70-100 nucleotides, or which are at least 1000 nucleotides or greater in length. Nucleic acids for use as probes or primers can differ in length as described herein.

Similarly, "amino acid sequence" as used herein refers to an
25 oligopeptide, peptide, polypeptide, or protein sequence, and fragments or portions thereof, and to naturally occurring or synthetic molecules. Amino acid sequence fragments are typically from about 4 or 5 to about 35, preferably from about 5 to about 15 or 25 amino acids in length and, optimally, retain the biological activity or function of the RET16 polypeptide.
30 However, it will be understood that larger amino acid fragments can be used, depending on the purpose therefor, e.g., fragments of from about 15 to about 50 or 60 amino acids.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 14 -

Where "amino acid sequence" is recited herein to refer to an amino acid sequence of a naturally occurring protein molecule, "amino acid sequence" and like terms, such as "polypeptide" or "protein" are not meant to limit the amino acid sequence to the complete, native amino acid sequence associated with the recited protein molecule. In addition, the terms RET16 polypeptide and RET16 protein are frequently used interchangeably herein to refer to the encoded product of the RET16 nucleic acid sequence of the present invention.

A variant of the RET16 polypeptide can refer to an amino acid sequence that is altered by one or more amino acids. The variant can have "conservative" changes, wherein a substituted amino acid has similar structural or chemical properties, e.g., replacement of leucine with isoleucine. More rarely, a variant can have "nonconservative" changes, e.g., replacement of a glycine with a tryptophan. Minor variations can also include amino acid deletions or insertions, or both. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing functional biological or immunological activity can be found using computer programs well known in the art, for example, DNASTAR software.

An allele or allelic sequence is an alternative form of the RET16 nucleic acid sequence. Alleles can result from at least one mutation in the nucleic acid sequence and can yield altered mRNAs or polypeptides whose structure or function may or may not be altered. Any given gene, whether natural or recombinant, can have none, one, or many allelic forms. Common mutational changes which give rise to alleles are generally ascribed to natural deletions, additions, or substitutions of nucleotides. Each of these types of changes can occur alone, or in combination with the others, one or more times in a given sequence.

Altered nucleic acid sequences encoding the RET16 polypeptide include nucleic acid sequences containing deletions, insertions and/or substitutions of different nucleotides resulting in a polynucleotide that encodes the same or a functionally equivalent RET16 polypeptide. Altered nucleic acid sequences can further include polymorphisms of the

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 15 -

polynucleotide encoding the RET16 polypeptide; such polymorphisms may or may not be readily detectable using a particular oligonucleotide probe. The encoded protein can also contain deletions, insertions, or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent RET16 protein of the present invention. Deliberate amino acid substitutions can 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 activity or function of RET16 protein is retained. For example, negatively charged amino acids can include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids can include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values can include leucine, isoleucine, and valine; glycine and alanine; asparagine and glutamine; serine and threonine; and phenylalanine and tyrosine.

“Peptide nucleic acid” (PNA) refers to an antisense molecule or anti-gene agent which comprises an oligonucleotide (“oligo”) linked to a peptide backbone of amino acid residues, which terminates in lysine. PNA typically comprise oligos of at least 5 nucleotides linked to amino acid residues. These small molecules stop transcript elongation by binding to their complementary strand of nucleic acid (P.E. Nielsen et al., 1993, *Anticancer Drug Des.*, 8:53-63). PNA can be pegylated to extend their lifespan in the cell where they preferentially bind to complementary single stranded DNA and RNA.

Oligonucleotides or oligomers (“oligos”) refer to a nucleic acid sequence, preferably comprising contiguous nucleotides, typically of at least about 6 nucleotides to about 60 nucleotides, preferably at least about 8 to 10 nucleotides in length, more preferably at least about 12 nucleotides in length, e.g., about 15 to 35 nucleotides, or about 15 to 25 nucleotides, or about 20 to 35 nucleotides, which can be typically used, for example, as probes or primers, in PCR amplification assays, hybridization assays, or in microarrays. It will be understood that the term oligonucleotide is substantially equivalent to the terms primer, probe, or amplimer, as

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 16 -

commonly defined in the art. It will also be appreciated by those skilled in the pertinent art that a longer oligonucleotide probe, or mixtures of probes, e.g., degenerate probes, can be used to detect longer, or more complex, nucleic acid sequences, for example, genomic DNA. In such cases, the probe can comprise at least 20-200 nucleotides, preferably, at least 30-100 nucleotides, more preferably, 50-100 nucleotides.

Amplification refers to the production of additional copies of a nucleic acid sequence and is generally carried out using polymerase chain reaction (PCR) technologies, which are well known and practiced in the art (See, D.W. Dieffenbach and G.S. Dveksler, 1995, *PCR Primer, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY).

Microarray is an array of distinct polynucleotides or oligonucleotides synthesized on a substrate, such as paper, nylon, or other type of membrane; filter; chip; glass slide; or any other type of suitable solid support.

The term antisense refers to nucleotide sequences, and compositions containing nucleic acid sequences, which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. The term "antisense strand" is used in reference to a nucleic acid strand that is complementary to the "sense" strand. Antisense (i.e., complementary) nucleic acid molecules include PNA and can be produced by any method, including synthesis or transcription. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form duplexes which block either transcription or translation. The designation "negative" is sometimes used in reference to the antisense strand, and "positive" is sometimes used in reference to the sense strand.

The term consensus refers to the sequence that reflects the most common choice of base or amino acid at each position among a series of related DNA, RNA, or protein sequences. Areas of particularly good agreement often represent conserved functional domains.

A deletion refers to a change in either nucleotide or amino acid sequence and results in the absence of one or more nucleotides or amino

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 17 -

acid residues. By contrast, an insertion (also termed "addition") refers to a change in a nucleotide or amino acid sequence that results in the addition of one or more nucleotides or amino acid residues, as compared with the naturally occurring molecule. A substitution refers to the replacement of one or more nucleotides or amino acids by different nucleotides or amino acids.

5 A derivative nucleic acid molecule refers to the chemical modification of a nucleic acid encoding, or complementary to, the encoded RET16 polypeptide. Such modifications include, for example, replacement of hydrogen by an alkyl, acyl, or amino group. A nucleic acid derivative
10 encodes a polypeptide which retains the essential biological and/or functional characteristics of the natural molecule. A derivative polypeptide is one which is modified by glycosylation, pegylation, or any similar process that retains the biological and/or functional or immunological activity of the polypeptide from which it is derived.

15 The term "biologically active", i.e., functional, refers to a protein or polypeptide or peptide fragment thereof having structural, regulatory, or biochemical functions of a naturally occurring molecule. Likewise, "immunologically active" refers to the capability of the natural, recombinant, or synthetic RET16, or any oligopeptide thereof, to induce a specific immune
20 response in appropriate animals or cells, for example, to generate antibodies, and to bind with specific antibodies.

The term hybridization refers to any process by which a strand of nucleic acid binds with a complementary strand through base pairing.

25 The term "hybridization complex" refers to a complex formed between two nucleic acid sequences by virtue of the formation of hydrogen bonds between complementary G and C bases and between complementary A and T bases. The hydrogen bonds can be further stabilized by base stacking interactions. The two complementary nucleic acid sequences hydrogen bond in an anti-parallel configuration. A hybridization complex can be
30 formed in solution (e.g., C₀t or R₀t analysis), or between one nucleic acid sequence present in solution and another nucleic acid sequence immobilized on a solid support (e.g., membranes, filters, chips, pins, or glass

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 18 -

slides, or any other appropriate substrate to which cells or their nucleic acids have been affixed).

The terms stringency or stringent conditions refer to the conditions for hybridization as defined by nucleic acid composition, salt and temperature.

- 5 These conditions are well known in the art and can be altered to identify and/or detect identical or related polynucleotide sequences in a sample. A variety of equivalent conditions comprising either low, moderate, or high stringency depend on factors such as the length and nature of the sequence (DNA, RNA, base composition), reaction milieu (in solution or immobilized
- 10 on a solid substrate), nature of the target nucleic acid (DNA, RNA, base composition), concentration of salts and the presence or absence of other reaction components (e.g., formamide, dextran sulfate and/or polyethylene glycol) and reaction temperature (within a range of from about 5°C below the melting temperature of the probe to about 20°C to 25°C below the melting
- 15 temperature). One or more factors can be varied to generate conditions, either low or high stringency, that are different from but equivalent to the aforementioned conditions.

- As will be understood by those of skill in the art, the stringency of hybridization can be altered in order to identify or detect identical or related
- 20 polynucleotide sequences. As will be further appreciated by the skilled practitioner, T_m can be approximated by the formulas as known in the art, depending on a number of parameters, such as the length of the hybrid or probe in number of nucleotides, or hybridization buffer ingredients and conditions (See, for example, T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A
- 25 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1982 and J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. F.M. Ausubel et al., Vol. 1, "Preparation and Analysis of DNA", John Wiley and Sons, Inc., 1994-1995, Suppls. 26, 29,
- 30 35 and 42; pp. 2.10.7- 2.10.16; G.M. Wahl and S. L. Berger (1987; Methods Enzymol. 152:399-407); and A.R. Kimmel, 1987; Methods of Enzymol. 152:507-511). As a general guide, T_m decreases approximately 1°C -1.5°C

- 19 -

with every 1% decrease in sequence homology. Also, in general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridization reaction is initially performed under conditions of low stringency, followed by washes of varying, but higher stringency. Reference to hybridization stringency, e.g., high, moderate, or low stringency, typically relates to such washing conditions.

Thus, by way of nonlimiting example, high stringency refers to conditions that permit hybridization of those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018M NaCl at about 65°C (i.e., if a hybrid is not stable in 0.018M NaCl at about 65°C, it will not be stable under high stringency conditions). High stringency conditions can be provided, for instance, by hybridization in 50% formamide, 5x Denhart's solution, 5xSSPE (saline sodium phosphate EDTA) (1x SSPE buffer comprises 0.15 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA), (or 1x SSC buffer containing 150 mM NaCl, 15 mM Na₃ citrate • 2 H₂O, pH 7.0), 0.2% SDS at about 42°C, followed by washing in 1x SSPE (or saline sodium citrate, SSC) and 0.1% SDS at a temperature of at least about 42°C, preferably about 55°C, more preferably about 65°C.

Moderate stringency refers, by way of nonlimiting example, to conditions that permit hybridization in 50% formamide, 5x Denhart's solution, 5xSSPE (or SSC), 0.2% SDS at 42°C (to about 50°C), followed by washing in 0.2x SSPE (or SSC) and 0.2% SDS at a temperature of at least about 42°C, preferably about 55°C, more preferably about 65°C.

Low stringency refers, by way of nonlimiting example, to conditions that permit hybridization in 10% formamide, 5x Denhart's solution, 6xSSPE (or SSC), 0.2% SDS at 42°C, followed by washing in 1x SSPE (or SSC) and 0.2% SDS at a temperature of about 45°C, preferably about 50°C.

For additional stringency conditions, see T. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982). It is to be understood that the low, moderate and high stringency hybridization / washing conditions can be varied using a variety of

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 20 -

ingredients, buffers and temperatures well known to and practiced by the skilled practitioner.

The terms complementary or complementarity refer to the natural binding of polynucleotides under permissive salt and temperature conditions by base-pairing. For example, the sequence "A-G-T" binds to the complementary sequence "T-C-A". Complementarity between two single-stranded molecules can be "partial", in which only some of the nucleic acids bind, or it can be complete when total complementarity exists between single stranded molecules. The degree of complementarity between nucleic acid strands has significant effects on the efficiency and strength of hybridization between nucleic acid strands. This is of particular importance in amplification reactions, which depend upon binding between nucleic acids strands, as well as in the design and use of PNA molecules.

The term homology refers to a degree of complementarity. There can be partial sequence homology or complete homology, wherein complete homology is equivalent to identity, e.g., 100% identity. A partially complementary sequence that at least partially inhibits an identical sequence from hybridizing to a target nucleic acid is referred to using the functional term "substantially homologous." The inhibition of hybridization of the completely complementary sequence to the target sequence can be examined using a hybridization assay (e.g., Southern or Northern blot, solution hybridization and the like) under conditions of low stringency. A substantially homologous sequence or probe will compete for and inhibit the binding (i.e., the hybridization) of a completely homologous sequence or probe to the target sequence under conditions of low stringency. Nonetheless, conditions of low stringency do not permit non-specific binding; low stringency conditions require that the binding of two sequences to one another be a specific (i.e., selective) interaction. The absence of non-specific binding can be tested by the use of a second target sequence which lacks even a partial degree of complementarity (e.g., less than about 30% identity). In the absence of non-specific binding, the probe will not hybridize to the second non-complementary target sequence.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 21 -

Those having skill in the art will know how to determine percent identity between/among sequences using, for example, algorithms such as those based on the CLUSTALW computer program (J.D. Thompson et al., 1994, *Nucleic Acids Research*, 2(22):4673-4680), or FASTDB, (Brutlag et al., 1990, *Comp. App. Biosci.*, 6:237-245), as known in the art. Although the FASTDB algorithm typically does not consider internal non-matching deletions or additions in sequences, i.e., gaps, in its calculation, this can be corrected manually to avoid an overestimation of the % identity. CLUSTALW, however, does take sequence gaps into account in its identity calculations.

Also available to those having skill in this art are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms (Altschul et al., 1977, *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 and Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410). The BLASTN program for nucleic acid sequences uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength (W) of 3, and an expectation (E) of 10. The BLOSUM62 scoring matrix (Henikoff & Henikoff, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:10915) uses alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands.

A composition comprising a given polynucleotide sequence refers broadly to any composition containing the given polynucleotide sequence. The composition can comprise a dry formulation or an aqueous solution. Compositions comprising polynucleotide sequence (e.g., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3) encoding RET16 polypeptide, or fragments thereof, can be employed as hybridization probes, or as primers. The probes and primers can be stored in freeze-dried form and can be in association with a stabilizing agent such as a carbohydrate. In hybridizations, the probe can be employed in an aqueous solution containing salts (e.g., NaCl), detergents or surfactants (e.g., SDS) and other components (e.g., Denhardt's solution, dry milk, salmon sperm DNA, and the like).

- 22 -

The term "substantially purified" refers to nucleic acid sequences or amino acid sequences that are removed from their natural environment, i.e., isolated or separated by a variety of means, and are at least 60% free, preferably 75% to 85% free, and most preferably 90% or greater free from other components with which they are naturally associated.

The term sample, or biological sample, is meant to be interpreted in its broadest sense. A biological sample suspected of containing nucleic acid encoding the RET16 protein, or fragments thereof, or the RET16 protein itself, can comprise a body fluid, an extract from cells or tissue, chromosomes isolated from a cell (e.g., a spread of metaphase chromosomes), organelle, or membrane isolated from a cell, a cell, nucleic acid such as genomic DNA (in solution or bound to a solid support such as for Southern analysis), RNA (in solution or bound to a solid support such as for Northern analysis), cDNA (in solution or bound to a solid support), a tissue, a tissue print and the like.

Transformation refers to a process by which exogenous DNA enters and changes a recipient cell. It can occur under natural or artificial conditions using various methods well known in the art. Transformation can rely on any known method for the insertion of foreign nucleic acid sequences into a prokaryotic or eukaryotic host cell. The method is selected based on the type of host cell being transformed and can include, but is not limited to, viral infection, electroporation, heat shock, lipofection, and partial bombardment. Such "transformed" cells include 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. Transformed cells also include those cells which transiently express the inserted DNA or RNA for limited periods of time.

The term "mimetic" refers to a molecule, the structure of which is developed from knowledge of the structure of the RET16 protein, or portions thereof, and as such, is able to effect some or all of the actions of the RET16 protein.

- 23 -

The term "portion" with regard to a protein (as in "a portion of a given protein") refers to fragments or segments, for example, peptides, of that protein. The fragments can range in size from four or five amino acid residues to the entire amino acid sequence minus one amino acid. Thus, a
5 protein "comprising at least a portion of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO:4" can encompass the full-length human RET16 polypeptide, and fragments or segments of full-length RET16.

The term antibody refers to intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, Fv, which are capable of binding an epitopic or
10 antigenic determinant. Antibodies that bind to RET16 polypeptides can be prepared using intact polypeptides or fragments containing small peptides of interest or prepared recombinantly for use as the immunizing antigen. The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal can be derived from the transition of RNA or synthesized chemically, and can be conjugated to a
15 carrier protein, if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin (BSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), and thyroglobulin. The coupled peptide is then used to immunize the animal (e.g. a mouse, a rat, or a rabbit).

The term "humanized" antibody refers to antibody molecules in which
20 amino acids have been replaced in the non-antigen binding regions in order to more closely resemble a human antibody, while still retaining the original binding capability, e.g., as described in U.S. Patent No. 5,585,089 to C.L. Queen et al.

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

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 24 -

The terms "specific binding" or "specifically binding" refer to the interaction between a protein or peptide and a binding molecule, such as an agonist, an antagonist, or an antibody. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure (e.g., an antigenic determinant or epitope, or a structural determinant) of the protein that is recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A", the presence of a protein containing epitope A (or free, unlabeled A) in a reaction containing labeled "A" and the antibody will reduce the amount of labeled A bound to the antibody.

The term "correlates with expression of a polynucleotide" indicates that the detection of the presence of ribonucleic acid that is similar to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 by Northern analysis is indicative of the presence of mRNA encoding the RET16 polypeptide in a sample and thereby correlates with expression of the transcript from the polynucleotide encoding the protein.

An alteration in the polynucleotide of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2 comprises any alteration in the sequence of the polynucleotides encoding the RET16 polypeptide, including deletions, insertions, and point mutations that can be detected using hybridization assays. Included within this definition is the detection of alterations to the genomic DNA sequence which encodes the RET16 polypeptide (e.g., by alterations in the pattern of restriction fragment length polymorphisms capable of hybridizing to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3), the inability of a selected fragment of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 to hybridize to a sample of genomic DNA (e.g., using allele-specific oligonucleotide probes), and improper or unexpected hybridization, such as hybridization to a locus other than the normal chromosomal locus for the polynucleotide sequence encoding the RET16 polypeptide (e.g., using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to metaphase chromosome spreads).

30 **Description of the Present Invention**

The present invention relates to RET16 polynucleotides and encoded polypeptides. Specifically described herein are RET16 (also called RET16.1

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 25 -

herein) and variants RET16.2 and RET16.3. All references to "RET16" shall be construed to apply to RET16 (RET16.1), RET16.2 and RET16.3, unless otherwise specified herein.

The novel RET16 gene described herein was discovered to be
5 expressed and upregulated in TNF-stimulated human lung microvascular endothelial cells. In accordance with the present invention, RNA expressed in TNF-stimulated human lung microvascular endothelial cells was analyzed to identify gene products that were likely to be involved in cellular regulatory events. Resting cells were stimulated for 1 hour with TNF-alpha, and the
10 RNA was isolated from the cells. Complementary DNA (cDNA) was produced from the isolated RNA employing conventional procedures known and used by those having skill in the art. The cDNAs that were upregulated following TNF-alpha stimulation of the microvascular endothelial cells were identified using subtractive hybridization. (See Example 1). Polynucleotide
15 cDNAs identified via this approach were assessed for potential roles in the signaling cascade as discussed below.

Accordingly, the role of the RET16 gene described herein was characterized using an antisense strategy (Examples 5 and 6). Toward this end, cells were transfected with antisense oligonucleotides and stimulated
20 with TNF-alpha. The antisense oligonucleotide that were capable of inhibiting RET16 RNA were evaluated to select an oligo capable of blocking RNA expression. The most active RET16 gene antisense was found to be the 11587 oligo having the following sequence:
UGCACAUGCCGCAAGGAGCCAUCU (SEQ ID NO:16).
25 The 11587 oligo inhibited the upregulation of E-selectin protein on the surface of transfected cells, thus suggesting a role for RET16 in the cell signaling cascade. (Example 6 and FIG. 9). Reduction of the RNA level of the RET16 gene is presumed to reduce the level of the RET16 protein in the cell. Consequently, reducing the level of RET16 protein in the cell was able
30 to interfere with the TNF-alpha signaling cascade, resulting in the decreased expression of E-selectin on the cell surface.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 26 -

As described in Example 6 and shown in FIG. 9, antisense oligonucleotides directed against the RET16 polynucleotide resulted in significant inhibition of E-selectin expression in TNF-stimulated HMVEC cells. These results imply that RET16 at least modulates E-selectin expression, either directly or indirectly. Preferably, the results indicate that RET16 represents a positive modulator of E-selectin, which is associated with a number of inflammatory disorders known in the art. Thus, antagonists of RET16 are useful for the treatment, prevention, and/or amelioration of inflammatory disorders, as discussed further herein.

Moreover, according to the present invention, antisense oligonucleotides directed against RET16 also resulted in inhibition of V-cam expression. These results imply that RET16 also at least modulates V-cam expression, either directly or indirectly. Preferably, the results indicate that RET16 represents a positive modulator of V-cam, as well.

E-selectin represents a positive marker for inflammatory conditions (D.J. Lefer, 2000, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40:283-94; A. Blann and M. Seigneur, 1997, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 17(1):3-11) with increased E-selectin being expressed on the extracellular membrane of a variety of cells and tissue cell types. This association is mediated through the role of E-selectin in modulating cellular rolling of circulating leukocytes on vascular endothelial cells. The expression of soluble forms of E-selectin and v-cam have also been associated with inflammatory disorders (A.J. Gearing and W. Newman, 1993, *Immunol. Today*, 14(10):506-12). Recent studies have shown E-selectin and V-cam expression to be associated with the incidence of asthma, and particularly with the incidence of severe asthma (A. Hamzaoui et al., 2001, *Am. J. Inflamm.*, 10(6):339-42).

In addition, E-selectin has been shown to be associated with the incidence of juvenile idiopathic arthritis (C.Y. Chen et al., 2002, *Ann. Rheum. Dis.*, 61(2):167-70). E-selectin has also been associated with the incidence of hematogenous metastases of tumor cells (K. Ito et al., 2001, *J. Gastroenterol.*, 36(12):823-9); E-selectin has been associated with the incidence of hyperinsulinaemia and diabetes type 2 (B.R. Winkelmann et al.,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 27 -

2001, *Curr. Med. Res. Opin.*, 17(2):132-41; and G. Targher et al., 2001, *Diabetes Care*, 24(11):1961-6; E-selectin has been associated with the incidence of atherosclerosis and cardiovascular disease (E. Demerath et al., 2001, *Ann. Hum. Biol.*, 28(6):664-78); E-selectin and V-cam have been
5 associated with the incidence of tumor progression and metastasis, in general, and particularly for colon cancer (D. Alexiou et al., 2001, *Eur. J. Cancer*, 37(18):2392-7); E-selectin has been associated with the incidence of Wegener's granulomatosis (N. Ohta et al., 2001, *Auris. Nasus. Larynx.*, 28(4):311-4); E-selectin and V-cam have been associated with the incidence
10 of stem cell transplantation complications (Y. Matsuda et al., 2001, *Bone Marrow Transplant.*, 27(9):977-82); E-selectin and V-cam have been associated with the incidence of thalassemia (D.S. Kyriakou et al., 2001, *Ann. Hematol.*, 80(10):577-83); E-selectin has been associated with the incidence of atherosclerosis (C.M. Ballantyne, 2001, *Clin. Cardiol.*, 24(8
15 Suppl):III13-7); E-selectin has been associated with the incidence of autoimmune disease (R.W. McMurray, 1996, *Semin. Arthritis. Rheum.*, 25(4):215-33); E-selectin has been associated with the incidence of atherosclerosis, ischemia-reperfusion injury, acute lung injury, rheumatoid arthritis, and graft rejection (M.P. Bevilacqua et al., 1994, *Ann. Rev. Med.*,
20 45:361-78); and E-selectin has been associated with the incidence of allergic inflammation (C.H. Smith et al., 1993, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148(6 Pt 2):S75-8). Thus, RET16 polynucleotides and polypeptides, including fragments or antagonists of RET16, are useful for the treatment, prevention, and/or amelioration of any of the foregoing disorders.

25 Polymorphic forms of E-selectin have also been associated with several diseases and disorders. For example, the A561C E-selectin polymorphism has been associated with systemic lupus erythematosus (Magadmi et al., 2001, *J. Rheumatol.*, 28(12):2650-2); the E-selectin S128R polymorphism has been associated with coronary artery calcification (D.L.
30 Ellsworth et al., 2001, *J. Mol. Med.*, 79(7):390-8); and additional E-selectin polymorphisms have been associated with the incidence of ischaemic heart conditions (F. Andreotti et al., 2002, *Heart.*, 87(2):107-12). Thus, RET16

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 28 -

polynucleotides and polypeptides, including fragments or antagonists of RET16, are useful for the treatment, prevention, and/or amelioration of any of the foregoing disorders.

In one of its embodiments, the present invention is directed to a
5 human RET16 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 as shown in FIGS. 2 and 3, or SEQ ID NO:4, as shown in FIG. 4B. The RET16 polypeptide product is 476 amino acids in length (SEQ ID NO:2, FIG. 2). The human RET16 polypeptide shares 31% identity with a portion of *Podospora anserina* Het-e-1 protein and 33% identity with a portion of
10 *Thermomonospora curvata* PKWA protein as shown in FIG. 10E. In addition, full-length mouse and partial rat orthologs of human RET16 were identified as described herein. For example, FIGS. 5 and 6 provide the nucleic acid sequence (SEQ ID NO:6) and the encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:7), respectively, of the murine RET16 ortholog. FIG.
15 13 provides the nucleic acid sequence (SEQ ID NO:8) of the partial rat RET16 ortholog and FIG. 14 shows the encoded amino acid sequence (SEQ ID NO:9) of the partial rat RET16 ortholog.

The RET16 amino acid sequence was found to contain several sequence motifs common to other known proteins using the MOTIFS
20 program in SEQWEB GCG. MOTIFS looks for protein motifs by searching protein sequences for regular-expression patterns described in the PROSITE Dictionary. The RET16 amino acid sequence contains 3 potential asparagine glycosylation sites at amino acids positions 150, 365, 460. In addition, the RET16 amino acid sequence contains potential cyclic
25 adenosine monophosphate (amino acids 441 and 442), casein kinase II (amino acids 7, 38, 136, 159, 164, 184, 194, 268, 333, and 370), and protein kinase C (amino acids 33, 38, 128, 136, 175, 439, 462) phosphorylation sites.

The RET16 amino acid sequence was used to search the PFAM-
30 HMM database for other protein domains. The PFAM-HMM database is a collection of protein families and domains and contains multiple protein alignments (A. Bateman et al., 1999, *Nucleic Acids Research*, 27:260-262).

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 29 -

Seven potential WD40, beta-transducin (G-beta) repeats were identified, in addition to one sterile alpha motif (SAM) domain (FIG. 17).

Beta-transducin (G-beta) is one of the three subunits (alpha, beta, and gamma) of the guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) which act as intermediaries in the transduction of signals generated by transmembrane receptors. Structurally G-beta consists of eight tandem repeats of about 40 residues, each containing a central Trp-Asp motif (this type of repeat is sometimes called a WD-40 repeat). Such a repetitive segment has been shown to exist in a number of other proteins, including G-beta-like peptides, yeast STE4, MSI1, CDC4, CDC20, MAK11, PRP4, PWP1 and TUP1, slime-mould AAC3 and coronin, and *Drosophila* Groucho protein. The number of repeats within these proteins varies between 5 (PRP4, TUP1, and Groucho) and 8 (G-beta, STE4, MSI1, AAC3, CDC4, PWP1, etc.). In G-beta and G-beta-like proteins, the repeats span the entire length of the sequence, while in other proteins, the repeats comprise the N-terminal, the central, or the C-terminal section. (E.J. Neer et al., 1994, *Nature*, 371:297-300).

The sterile alpha motif (SAM) domain is a putative protein interaction module present in a wide variety of proteins involved in many biological processes. The SAM domain of approximately 70 residues is found in diverse eukaryotic organisms. SAM domains have been shown to homo- and hetero-oligomerize, but with a low binding affinity, and to mediate specific protein-protein interactions. Structural analyses show that the SAM domain is arranged in a small five-helix bundle with two large interfaces. In the case of the SAM domain of the Eph tyrosine kinase EphB2, each of these interfaces is able to form dimers. The presence of these two distinct binding surfaces suggests that SAM domains could form extended polymeric structures (D. Stapleton et al., 1999, *Nature Struct. Biol.*, 6:44-49).

The Incyte Genomics Lifeseq Gold database was used to perform preliminary expression analysis of RET16. According to the electronic Northern in the Incyte database (Template ID 158923.9; Clone ID 3111127), the RET16 gene sequence was identified in 56 cDNA libraries. These

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 30 -

libraries which were found to express the RET16 gene are shown in FIG. 12. Of special interest, RET16 was found to be expressed in several tumor tissues, including those from kidney, prostate, pituitary, esophagus, ovary, urinary bladder, lung, colon, paraganglion, adrenal, liver, uterus, and pancreas tissue. In addition, RET16 was found to be expressed in tissues from the following disease states: Huntington's disease, leukemia, cholelithiasis, epilepsy, chronic ulcerative colitis, Alzheimer's disease, and lymphocytic thyroiditis. Of particular note, RET16 was found to be expressed in bronchial epithelial cells treated with 20% smoke for 20 hours, CD4+ T-lymphocytes treated with CD3 antibodies, a K-562 chronic myelogenous leukemia precursor line treated with 1 μ M 5-aza-2'deoxyctidine for 72 hours, and umbilical cord mononuclear cells treated with IL-5.

Another embodiment of the present invention encompasses a murine ortholog, i.e., muRET16, of the human RET16 (huRET6) gene. To identify the murine ortholog of huRET16, the coding sequence of huRET16 was used to search the mouse EST database, available to those in the art for performing the basic local alignment search tool (BLAST) analyses. The following murine EST's were identified: AU035693, AA118718, AA204608, W41056, AW146018, AI450495, AI875443, AI316544, AW494796, AW146018 and BE983890. The muRET16 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:6) has 80% identity with huRET16. The encoded muRET16 amino acid sequence (SEQ ID NO:7) is 82.5% identical to huRET16 (86.5% similarity). MuRET16 has 7 predicted WD repeats and 1 SAM domain, all having a score of >10.

The carboxyl terminus of RET16 contains a U box domain, as determined based upon a Hidden Markov Model E value of 1.78e-23. The homology of the RET16 U box domain with the U box of protein PRP19 (S.C. Cheng et al., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13(3):1876-82) and the alignment of consensus residues is shown in FIG. 21 (conserved residue annotation modified from Aravind and Koonin, 2001, *Current Biology*, 10(4):R132-

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 31 -

R134. PRP 19, is a pre-mRNA splicing factor that, in addition to the U box, contains WD40 repeats.

The U box domain-containing proteins typified by UFD2 mediate E3 ubiquitin conjugation reactions (Aravind and Koonin, *Ibid*). E3 ubiquitin
5 ligases participate in the transfer of ubiquitin from an E2 ubiquitin ligase onto a substrate protein. Recent publications have provided strong evidence for the ubiquitin ligase activity of a series of U box-containing proteins (see, e.g., Hatakeyama et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(35):33111-33120; Murata et al., 2001, *EMBO*, 21(121):1133-1138; Meachem et al., 2001, *Nature Cell*
10 *Biology*, 3:100-105; and Pringa et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(22):19617-19623). In a reconstitution assay, the U box-containing protein provided E3 ubiquitin ligase activity in the presence of E1 and E2 ubiquitin ligases. In addition, deletion of the U box, or mutation of key conserved residues in the U box protein, abrogated the ubiquitin ligase activity. (Hatakeyama et al.,
15 2001, *Ibid*.) The U box ubiquitin ligases are structurally distinct from HECT or RING finger E3s, and can be distinguished functionally by the ability to catalyze polyubiquitination of substrate proteins.

Multiple key regulatory proteins in the cell are modified by the addition of ubiquitin. Proteosomal degradation of ubiquitinated proteins
20 controls a number of cellular events such as the cell cycle, differentiation, immune responses and clearance of misfolded proteins. In view of its U box domain, which is a feature of proteins that mediate ubiquitination, in particular, E3 ubiquitin conjugation reactions, RET16 is characterized as a ubiquitin ligase.

25 To determine E3 ubiquitin ligase activity, assays can be performed as described in Hatakeyama et al., 2001, *Ibid*., Murata et al. 2001, *Ibid*. and Meachem et al., 2001, *Ibid*.). Site directed mutagenesis can be used to identify those amino acids in a ubiquitin ligase protein that are necessary for ubiquitin ligase activity. In addition, deletion of all or a portions of the U box
30 can be performed to confirm the role of the U box in mediating ubiquitin ligase activity. A polynucleotide encoding RET16 containing a deleted or mutated U box can be transfected into cells to reveal the functional role of

- 32 -

expressed RET16 protein intracellularly. This same approach is amenable for isolating and identifying cellular substrate(s) for the ubiquitin ligases.

RET16 Polynucleotides and Polypeptides

The present invention encompasses a human RET16 nucleic acid
5 sequence (SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3) encoding the RET16 polypeptide
(SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, respectively) and the use of the RET16
polynucleotides, polypeptides, or compositions thereof, in methods for
screening for antagonists or inhibitors of the interaction of RET16 with other
cellular signaling components involved generally in inflammatory processes,
10 cell activation, or uncontrolled cell growth, and specifically in TNF-activated
endothelium.

This invention further embraces an isolated nucleic acid or
polypeptide molecule that is at least about 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,
85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,
15 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, or
99.9% identical to a RET16 nucleic acid sequence or amino acid sequence
according to the present invention. More specifically, the invention
encompasses an isolated polynucleotide, or fragment thereof, having a
nucleotide sequence that is at least 82.0% identical to the sequence of SEQ
20 ID NO:12; an isolated polynucleotide, or fragment thereof, having a
nucleotide sequence that is at least 68.2% identical to the sequence of SEQ
ID NO:12; and an isolated polynucleotide, or fragment thereof, having a
nucleotide sequence that is at least 93.1% identical to the sequence of SEQ
ID NO:14. In addition, the present invention encompasses an isolated
25 polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a
cell signaling polypeptide, where the polypeptide has at least 82% sequence
identity to the sequence of SEQ ID NO:13; and an isolated polynucleotide,
or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling
polypeptide, where the polypeptide has at least 95.0% sequence identity
30 with the sequence of SEQ ID NO:15. The invention further encompasses an
isolated and/or substantially purified cell signaling protein having an amino
acid sequence that has at least 82% sequence identity with the sequence as

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 33 -

set forth in SEQ ID NO:13; and an isolated and/or substantially purified cell signaling protein having an amino acid sequence that has at least 95% sequence identity with the sequence as set forth in SEQ ID NO:15.

Also encompassed by the invention is the use of the RET16 nucleic acid sequence and the RET16 polypeptide, or molecules that interact with all or a portion of the RET16 nucleic acid or amino acid sequence in methods for diagnosing, treating or preventing disorders or diseases associated with inflammation and cellular inflammatory processes or with cell growth or cell activation processes. In addition, the RET16 gene and polypeptide are useful for determining those cellular signaling molecules that associate with RET16 and which provide critical signals for the signaling cascade that can be involved with the master switch related to the development of inflammatory processes or intracellular signaling events triggered by receptor activation, stimulation, or uncontrolled cell growth.

According to the present invention, nucleic acid encoding human RET16 protein was first identified in a subtraction cDNA library from TNF-alpha-stimulated human lung microvascular endothelial cells. The full-length RET16 gene was isolated by extending clone sequences available from the Incyte and public EST databases, as described in Example 1.

In one of its embodiments, the present invention encompasses a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 as shown in FIGS. 2 and 3 and the open reading frame amino acid sequence of SEQ ID NO:4 as shown in FIG. 4B. The human RET16 polypeptide is 476 amino acids in length. FIGS. 10A-10E portray the structural similarities among RET16 and several other proteins, namely a portion of *Podospora anserina* vegetable incompatibility protein Het-E-1; a portion of *Thermomonospora curvata* putative serine/threonine-protein kinase PWKA; the RET16 murine ortholog, and the partial RET16 rat ortholog.

Variants of the RET16 polypeptide are also encompassed by the present invention. In one aspect, a RET16 variant has at least 75 to 80%, preferably at least 85 to 90%, and more preferably at least 90% amino acid sequence identity to the amino acid sequence (SEQ ID NO:2 or SEQ ID

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 34 -

NO:4) disclosed herein, and which retains at least one biological, immunological, or other functional characteristic or activity of the RET16 polypeptide. Most preferred is a variant having at least 95% amino acid sequence identity to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 or

5 SEQ ID NO:4. An amino acid sequence variant of the RET16 protein can be categorized into one or more of three classes: substitutional, insertional, or deletional variants. Such variants are typically prepared by site-specific mutagenesis of nucleotides in the DNA encoding the RET16 protein, using cassette or PCR mutagenesis, or other techniques that are well known and

10 practiced in the art, to produce DNA encoding the variant. Thereafter, the DNA is expressed in recombinant cell culture as described herein. Variant RET16 protein fragments having up to about 100-150 residues can be prepared by *in vitro* synthesis using conventional techniques. Two variants, RET16.2 and RET16.3 are described herein (see, Example 2; FIG. 16 --

15 multiple sequence alignments; FIG. 18 -- exon structure; FIGS. 19A and 19B, polynucleotide sequence (SEQ ID NO:12) and amino acid sequence (SEQ ID NO:13), respectively, of variant RET16.2; and FIGS. 20A and 20B, polynucleotide sequence (SEQ ID NO:14) and amino acid sequence (SEQ ID NO:15), respectively, of variant RET16.3).

20 Amino acid sequence variants are characterized by the predetermined nature of the variation, a feature that sets them apart from naturally occurring allelic or interspecies variations of the RET16 protein amino acid sequence. The variants typically exhibit the same qualitative biological activity as that of the naturally occurring analogue, although

25 variants can also be selected having modified characteristics. While the site or region for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the mutation *per se* need not be predetermined. For example, in order to optimize the performance of a mutation at a given site, random mutagenesis can be performed at the target codon or region, and the expressed RET16

30 variants screened for the optimal combination of desired activity. Techniques for making substitution mutations at predetermined sites in DNA having a known sequence are well known, for example, M13 primer

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 35 -

mutagenesis and PCR mutagenesis. Screening of the mutants is accomplished using assays of RET16 protein activities, for example, for binding domain mutations, competitive binding studies can be carried out.

Amino acid substitutions are typically of single residues; insertions usually are on the order of from one to twenty amino acids, although considerably larger insertions can be tolerated. Deletions range from about one to about 20 residues, although in some cases, deletions can be much larger.

Substitutions, deletions, insertions, or any combination thereof, can be used to arrive at a final RET16 derivative. Generally, these changes affect only a few amino acids to minimize the alteration of the molecule. However, larger changes can be tolerated in certain circumstances. When small alterations in the characteristics of the RET16 protein are desired or warranted, substitutions are generally made in accordance with the following

Table 1:

Table 1

| Original Residue | Exemplary Substitutions |
|------------------|-------------------------|
| Ala | Ser |
| Arg | Lys |
| Asn | Gln, His |
| Asp | Glu |
| Cys | Ser |
| Gln | Asn |
| Glu | Asp |
| Gly | Pro |
| His | Asn, Gln |
| Ile | Leu, Val |
| Leu | Ile, Val |
| Lys | Arg, Gln, Glu |
| Met | Leu, Ile |
| Phe | Met, Leu, Tyr |
| Ser | Thr |
| Thr | Ser |
| Trp | Tyr |
| Tyr | Trp, Phe |
| Val | Ile, Leu |

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 36 -

Substantial changes in function or immunological identity are made by selecting substitutions that are less conservative than those shown in Table 1. For example, substitutions can be made which more significantly affect the structure of the polypeptide backbone in the area of the alteration, 5 for example, the alpha-helical, or beta-sheet structure; the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site; or the bulk of the side chain. The substitutions which generally are expected to produce the greatest changes in the polypeptide's properties are those in which (a) a hydrophilic residue, e.g., seryl or threonyl, is substituted for (or by) a 10 hydrophobic residue, e.g., leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl, or alanyl; (b) a cysteine or proline is substituted for (or by) any other residue; (c) a residue having an electropositive side chain, e.g., lysyl, arginyl, or histidyl, is substituted for (or by) an electronegative residue, e.g., glutamyl or aspartyl; or (d) a residue having a bulky side chain, e.g., phenylalanine, is substituted 15 for (or by) a residue that does not have a side chain, e.g., glycine.

While RET16 variants will ordinarily exhibit the same qualitative biological activity or function, and elicit the same immune response, as the naturally occurring analogue, the variants are also selected to modify the characteristics of the RET16 protein as needed. Alternatively, the variant 20 can be designed such that the biological activity of the RET16 protein is altered.

In another embodiment, the present invention encompasses polynucleotides which encode the RET16 polypeptide. Accordingly, any nucleic acid sequence which encodes the amino acid sequence of the 25 RET16 polypeptide can be used to produce recombinant molecules that express RET16 protein. In a particular embodiment, the present invention encompasses the RET16 polynucleotide comprising the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:3, as shown in FIGS. 1 and 4A, respectively, and the murine ortholog of human RET16 comprising the 30 nucleic acid sequence of SEQ ID NO:6, as well as the rat ortholog of human RET16 comprising the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:8. More particularly, the present invention provides cloned full-length open reading

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 37 -

frame human RET16 cDNA (1532 bp), (also called RET16.1) deposited at the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 on March 7, 2001 under ATCC Accession No. PTA-3161 according to the terms of the Budapest Treaty.

5 In a preferred embodiment, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition to the resulting encoded polypeptide of RET16.1. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to nucleotides 151 through 1575 of SEQ ID NO:1, and the polypeptide corresponding to amino acids 2
10 through 476 of SEQ ID NO:2. Also encompassed are recombinant vectors comprising the RET16.1 encoding sequence, and host cells comprising the vector as described herein.

In another preferred embodiment, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition
15 to the resulting encoded polypeptide of RET16.2. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to nucleotides 114 through 1262 of SEQ ID NO:12, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 384 of SEQ ID NO:13. Also encompassed are recombinant vectors comprising the RET16.2 encoding sequence, and host cells
20 comprising the vector as described herein.

In another preferred embodiment, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition to the resulting encoded polypeptide of RET16.3. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to nucleotides 139
25 through 1641 of SEQ ID NO:14, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 502 of SEQ ID NO:15. Also encompassed are recombinant vectors comprising the RET16.3 encoding sequence, and host cells comprising the vector as described herein.

In another preferred embodiment, the present invention encompasses a polynucleotide lacking the initiating start codon, in addition
30 to the resulting encoded polypeptide of the mouse RET16. Specifically, the present invention encompasses the polynucleotide corresponding to

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 38 -

nucleotides 19 through 1443 of SEQ ID NO:6, and the polypeptide corresponding to amino acids 2 through 475 of SEQ ID NO:7. Also encompassed are recombinant vectors comprising the mouse RET16 encoding sequence, and host cells comprising the vector as described
5 herein.

As will be appreciated by the skilled practitioner in the art, the degeneracy of the genetic code results in the production of numerous nucleotide sequences encoding the RET16 polypeptide of the present invention. Some of the sequences bear minimal homology to the nucleotide
10 sequences of any known and naturally occurring gene. Accordingly, the present invention contemplates each and every possible variation of nucleotide 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 nucleotide sequence
15 of naturally occurring RET16, and all such variations are to be considered as being specifically disclosed.

Although nucleotide sequences which encode the RET16 polypeptide and its variants are preferably capable of hybridizing to the nucleotide sequence of the naturally occurring RET16 polypeptide under appropriately
20 selected conditions of stringency, it may be advantageous to produce nucleotide sequences encoding the RET16 polypeptide, or its derivatives, which possess a substantially different codon usage. Codons can be selected to increase the rate at which expression of the peptide/polypeptide occurs in a particular prokaryotic or eukaryotic host in accordance with the
25 frequency with which particular codons are utilized by the host, for example, in plant cells or yeast cells or amphibian cells. Other reasons for substantially altering the nucleotide sequence encoding the RET16 polypeptide, and its derivatives, without altering the encoded amino acid sequences include the production of mRNA transcripts having more
30 desirable properties, such as a greater half-life, than transcripts produced from the naturally occurring sequence.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 39 -

The present invention also encompasses production of DNA sequences, or portions thereof, which encode the RET16 polypeptide, and its derivatives, entirely by synthetic chemistry. After production, the synthetic sequence can be inserted into any of the many available
5 expression vectors and cell systems using reagents that are well known and practiced by those in the art. Moreover, synthetic chemistry can be used to introduce mutations into a sequence encoding RET16 polypeptide, or any fragment thereof.

Also encompassed by the present invention are polynucleotide
10 sequences that are capable of hybridizing to the claimed nucleotide sequence of RET16, such as that shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, under various conditions of stringency. Hybridization conditions are typically based on the melting temperature (T_m) of the nucleic acid binding complex or probe (See, G.M. Wahl and S.L. Berger, 1987; *Methods Enzymol.*,
15 152:399-407 and A.R. Kimmel, 1987; *Methods of Enzymol.*, 152:507-511), and can be used at a defined stringency. For example, included in the present invention are sequences capable of hybridizing under moderately stringent conditions to the RET16 nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 and other sequences which are degenerate to those which
20 encode the RET16 polypeptide (e.g., as a nonlimiting example: prewashing solution of 2X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA, pH 8.0, and hybridization conditions of 50°C, 5XSSC, overnight).

In another embodiment of the present invention, polynucleotide sequences or fragments (peptides) thereof which encode the RET16
25 polypeptide can be used in recombinant DNA molecules to direct the expression of the RET16 polypeptide product, or fragments or functional equivalents thereof, in appropriate host cells. Because of the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences, which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence,
30 can be produced and these sequences can be used to express RET16 protein.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 40 -

As will be appreciated by those having skill in the art, it may be advantageous to produce RET16 polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce a recombinant RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

The nucleotide sequence of the present invention can be engineered using methods generally known in the art in order to alter RET16 polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including, but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the gene product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, or introduce mutations, and the like.

In another embodiment of the present invention, natural, modified, or recombinant nucleic acid sequences, or a fragment thereof, encoding the RET16 polypeptide can be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening peptide libraries for inhibitors or modulators of RET16 activity or binding, it may be useful to encode a chimeric RET16 protein that can be recognized by a commercially available antibody. A fusion protein can also be engineered to contain a cleavage site located between the RET16 protein-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the RET16 protein can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

Accordingly, the present invention encompasses a substantially purified cell signaling protein that is involved in the cell signaling cascade and is encoded by a polynucleotide having a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NOS:1, 3, 5, 6, 8, 12, or 14 or a nucleic acid sequence

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 41 -

degenerate from that of SEQ ID NOS:1, 3, 5, 6, 8, 12, or 14, as a result of
redundancy of the genetic code. Such a fusion protein can further comprise
all or a portion of the amino acid sequence of SEQ ID NOS:2, 4, 7, 9, 13, or
15, or an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the
5 sequence as set forth in SEQ ID NOS:2, 4, 7, 9, 13, or 15, and an amino
acid sequence of a second protein.

In another embodiment, ligand-binding assays are useful to identify
inhibitor compounds that interfere with the function of the RET16 product, or
activator compounds that stimulate the function of the RET16 protein. Such
10 assays are useful even if the function of a protein is not known. These
assays are designed to detect binding of test compounds to particular target
molecules, e.g., proteins or peptides. The detection can involve direct
measurement of binding. Alternatively, indirect indications of binding can
involve stabilization of protein structure, or disruption or enhancement of a
15 biological function. Non-limiting examples of useful ligand-binding assays
are detailed below.

One useful method for the detection and isolation of binding proteins
is the Biomolecular Interaction Assay (BIAcore) system developed by
Pharmacia Biosensor and described in the manufacturer's protocol (LKB
20 Pharmacia, Sweden). The BIAcore system uses an affinity purified anti-
GST antibody to immobilize GST-fusion proteins onto a sensor chip. The
sensor utilizes surface plasmon resonance, which is an optical phenomenon
that detects changes in refractive indices. Accordingly, a protein of interest,
e.g., the RET16 polypeptide, or fragment thereof, of the present invention, is
25 coated onto a chip and test compounds are passed over the chip. Binding is
detected by a change in the refractive index (surface plasmon resonance).

A different type of ligand-binding assay involves scintillation proximity
assays (SPA), as described in U.S. Patent No. 4,568,649. In a modification
of this assay currently undergoing development, chaperonins are used to
30 distinguish folded and unfolded proteins. A tagged protein is attached to
SPA beads, and test compounds are added. The bead is then subjected to
mild denaturing conditions, such as, for example, heat, exposure to SDS,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 42 -

and the like, and a purified labeled chaperonin is added. If a test compound has bound to a target protein, the labeled chaperonin will not bind; conversely, if no test compound has bound, the protein will undergo some degree of denaturation and the chaperonin will bind. In another type of
5 ligand binding assay, proteins containing mitochondrial targeting signals are imported into isolated mitochondria *in vitro* (Hurt et al., 1985, *EMBO J.*, 4:2061-2068; Eilers and Schatz, 1986, *Nature*, 322:228-231). In a mitochondrial import assay, expression vectors are constructed in which nucleic acids encoding particular target proteins are inserted downstream of
10 sequences encoding mitochondrial import signals. The chimeric proteins are synthesized and tested for their ability to be imported into isolated mitochondria in the absence and presence of test compounds. A test compound that binds to the target protein should inhibit its uptake into isolated mitochondria *in vitro*.

15 Another type of ligand-binding assay suitable for use according to the present invention is the yeast two-hybrid system (Fields and Song, 1989, *Nature*, 340:245-246). The yeast two-hybrid system takes advantage of the properties of the GAL4 protein of the yeast *S. cerevisiae*. The GAL4 protein is a transcriptional activator required for the expression of genes encoding
20 enzymes involving the utilization of galactose. GAL4 protein consists of two separable and functionally essential domains: an N-terminal domain, which binds to specific DNA sequences (UASG); and a C-terminal domain containing acidic regions, which is necessary to activate transcription. The native GAL4 protein, containing both domains, is a potent activator of
25 transcription when yeast cells are grown on galactose medium. The N-terminal domain binds to DNA in a sequence-specific manner but is unable to activate transcription. The C-terminal domain contains the activating regions but cannot activate transcription because it fails to be localized to UASG. In the two-hybrid system, a system of two hybrid proteins containing
30 parts of GAL4: (1) a GAL4 DNA-binding domain fused to a protein 'X', and (2) a GAL4 activation region fused to a protein 'Y'. If X and Y can form a protein-protein complex and reconstitute proximity of the GAL4 domains,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 43 -

transcription of a gene regulated by UASG occurs. Creation of two hybrid proteins, each containing one of the interacting proteins X and Y, allows the activation region of UASG to be brought to its normal site of action.

The binding assay described in Fodor et al., 1991, *Science*, 251:767-773, which involves testing the binding affinity of test compounds for a plurality of defined polymers synthesized on a solid substrate, can also be useful. Compounds that bind to the RET16 polypeptide, or portions thereof, according to this invention are potentially useful as agents for use in therapeutic compositions.

In another embodiment, sequences encoding the RET16 polypeptide can be synthesized in whole, or in part, using chemical methods well known in the art (See, for example, M.H. Caruthers et al., 1980, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, 215-223 and T. Horn, T et al., 1980, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, 225-232). Alternatively, the protein itself can be produced using chemical methods to synthesize the amino acid sequence of the RET16 polypeptide, or a fragment or portion thereof. For example, peptide synthesis can be performed using various solid-phase techniques (J.Y. Roberge et al., 1995, *Science*, 269:202-204) and automated synthesis can be achieved, for example, using the ABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems).

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., T. Creighton, 1983, *Proteins, Structures and Molecular Principles*, WH Freeman and Co., New York, N.Y.), by reversed-phase high performance liquid chromatography, or other purification methods as are known in the art. The composition of the synthetic peptides can be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; Creighton, *supra*). In addition, the amino acid sequence of the RET16 polypeptide or any portion thereof, can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with sequences from other proteins, or any part thereof, to produce a variant polypeptide.

- 44 -

Expression of Human RET16 Protein

To express a biologically active / functional RET16 polypeptide or peptide, the nucleotide sequences encoding the RET16 polypeptide, or functional equivalents, can be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods which are well known to and practiced by those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding the RET16 polypeptide and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described in J. Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. and in F.M. Ausubel et al., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding the RET16 polypeptide. Such expression vector/host systems include, but are not limited to, microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast or fungi transformed with yeast or fungal expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (e.g., baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus (CaMV) and tobacco mosaic virus (TMV)), or with bacterial expression vectors (e.g., Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems. The host cell employed is not limiting to the present invention.

"Control elements" or "regulatory sequences" are those non-translated regions of the vector, e.g., enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions, which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number

- 45 -

of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, La Jolla, CA) or PSPORT1 plasmid 5 (Life Technologies), and the like, can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant cells (e.g., heat shock, RUBISCO; and storage protein genes), or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences), can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from 10 mammalian genes or from mammalian viruses are preferred. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of the sequence encoding RET16, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

In bacterial systems, a number of expression vectors can be 15 selected, depending upon the use intended for the expressed RET16 product. For example, when large quantities of expressed protein are needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, the multifunctional *E. coli* cloning and 20 expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene), in which the sequence encoding the RET16 polypeptide, or a peptide thereof, can be ligated into the vector in-frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of β -galactosidase, so that a hybrid protein is produced; pIN vectors (See, G. Van Heeke and S.M. Schuster, 1989, *J. Biol.* 25 *Chem.*, 264:5503-5509); and the like. pGEX vectors (Promega, Madison, WI) can also be used to express foreign polypeptides, as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can be easily purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free 30 glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor XA protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

- 46 -

In the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. (For reviews, see F.M. Ausubel et al., *supra*, and Grant et al., 1987, *Methods Enzymol.*, 153:516-544).

5 Should plant expression vectors be desired and used, the expression of sequences encoding the RET16 polypeptide can be driven by any of a number of promoters. For example, viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (N. Takamatsu, 1987, *EMBO J.*, 6:307-
10 311). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO, or heat shock promoters, can be used (G. Coruzzi et al., 1984, *EMBO J.*, 3:1671-1680; R. Broglie et al., 1984, *Science*, 224:838-843; and J. Winter et al., 1991, *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). These constructs can be
15 introduced into plant cells by direct DNA transformation or pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (See, for example, S. Hobbs or L.E. Murry, In: McGraw Hill *Yearbook of Science and Technology* (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

An insect system can also be used to express the RET16 polypeptide
20 For example, in one such system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells or in *Trichoplusia* larvae. The sequences encoding the RET16 polypeptide can be cloned into a non-essential region of the virus such as the polyhedrin gene and placed under control of the
25 polyhedrin promoter. Successful insertion of the RET16 polypeptide will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect, for example, *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which the RET16 polypeptide product can be expressed (E.K. Engelhard et al., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 91:3224-3227).
30

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems can be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 47 -

vector, sequences encoding the RET16 polypeptide can be ligated into an adenovirus transcription/ translation complex containing the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus which is capable of
5 expressing the RET16 polypeptide in infected host cells (J. Logan and T. Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:3655-3659). In addition, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.

Specific initiation signals can also be used to achieve more efficient
10 translation of sequences encoding the RET16 polypeptide. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding the RET16 polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed.
15 However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals, including the ATG initiation codon, should be provided. Furthermore, the initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various
20 origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system that is used, such as those described in the literature (D. Scharf et al., 1994, *Results Probl. Cell Differ.*, 20:125-162).

Moreover, a host cell strain can be chosen for its ability to modulate
25 the expression of the inserted sequences or to process the expressed protein in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the protein can also be used to facilitate
30 correct insertion, folding and/or function. Different host cells having specific cellular machinery and characteristic mechanisms for such post-translational activities (e.g., COS, CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and W138) are available

- 48 -

from the American Type Culture Collection (ATCC), American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

- 5 For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the RET16 protein can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same, or on a separate, vector.
- 10 Following the introduction of the vector, cells can be allowed to grow for 1-2 days in an enriched cell culture medium before they are switched to selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows the growth and recovery of cells which successfully express the introduced sequences. Resistant
- 15 clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

- Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the Herpes Simplex Virus thymidine kinase (HSV TK), (M. Wigler et al., 1977, *Cell*, 11:223-32) and
- 20 adenine phosphoribosyltransferase (I. Lowy et al., 1980, *Cell*, 22:817-23) genes which can be employed in tk⁻ or aprt⁻ cells, respectively. Also, anti-metabolite, antibiotic or herbicide resistance can be used as the basis for selection; for example, dhfr, which confers resistance to methotrexate (M. Wigler et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:3567-70); npt, which confers
- 25 resistance to the aminoglycosides neomycin and G-418 (F. Colbere-Garapin et al., 1981, *J. Mol. Biol.*, 150:1-14); and als or pat, which confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murry, *supra*). Additional selectable genes have been described, for example, trpB, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or hisD, which
- 30 allows cells to utilize histinol in place of histidine (S.C. Hartman and R.C. Mulligan, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8047-51). Recently, the use of visible markers has gained popularity with such markers as the

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 49 -

anthocyanins, β -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, which are widely used not only to identify transformants, but also to quantify the amount of transient or stable protein expression that is attributable to a specific vector system (C.A. Rhodes et al., 1995, *Methods* 5 *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 desired gene of interest may need to be confirmed. For example, if the RET16 nucleic acid sequence polypeptide is inserted within a marker gene 10 sequence, recombinant cells containing sequences encoding the RET16 polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding the RET16 polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually 15 indicates co-expression of the tandem gene.

Alternatively, host cells which contain the nucleic acid sequence encoding the RET16 polypeptide and which express the RET16 polypeptide product can be identified by a variety of procedures known to those having skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA 20 or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques, including membrane, solution, or chip based technologies, for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein.

Preferably, the RET16 polypeptide is substantially purified after expression. RET16 proteins can be isolated or purified in a variety of ways 25 known to and practiced by those having skill in the art, depending on what other components can be present in the sample. Standard purification methods include electrophoretic, molecular, immunological and chromatographic techniques, including, but not limited to, ion exchange, hydrophobic affinity and reverse phase HPLC chromatography, and 30 chromatofocusing. For example, the RET16 protein can be purified using a standard anti-RET16 antibody column. Ultrafiltration and diafiltration techniques, in conjunction with protein concentration, are also useful. For

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 50 -

general guidance in suitable purification techniques, see R. Scopes, 1982, *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY. As will be understood by the skilled practitioner, the degree of purification necessary will vary depending on the intended use of the RET16 protein; in some instances, no purification
5 will be necessary.

In addition to recombinant production, fragments of the RET16 polypeptide can be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques (J. Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154). Protein synthesis can be performed using manual techniques or by automation.
10 Automated synthesis can be achieved, for example, using ABI 431A Peptide Synthesizer (PE Biosystems). Various fragments of the RET16 polypeptide can be chemically synthesized separately and then combined using chemical methods to produce the full length molecule.

Detection of Human RET16 Polynucleotide

15 The presence of polynucleotide sequences encoding the RET16 polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization, or by amplification using probes or portions or fragments of polynucleotides encoding the RET16 polypeptide. Nucleic acid amplification based assays involve the use of oligonucleotides or oligomers, based on the sequences
20 encoding the RET16 polypeptide, to detect transformants containing DNA or RNA encoding the RET16 polypeptide.

A wide variety of labels and conjugation techniques are known and employed by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR
25 probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding the RET16 polypeptide include oligo-labeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, the sequences encoding the RET16 polypeptide, or any portions or fragments thereof, can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors
30 are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA

- 51 -

polymerase, such as T7, T3, or SP(6) and labeled nucleotides. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (e.g., Amersham Pharmacia Biotech, Promega and U.S. Biochemical Corp.). Suitable reporter molecules or labels which can be used include

5 radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

Human RET16 Polypeptide – Production, Detection, Isolation

Host cells transformed with nucleotide sequences encoding the

10 RET16 protein, or fragments thereof, can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those having skill in the art, expression vectors containing

15 polynucleotides which encode the RET16 protein can be designed to contain signal sequences which direct secretion of the RET16 protein through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

Other constructions can be used to join nucleic acid sequences encoding the RET16 protein to nucleotide sequence encoding a polypeptide

20 domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals; protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin; and the domain utilized in the FLAGS extension/affinity

25 purification system (Immunex Corp., Seattle, WA). The inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor XA or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the RET16 protein can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing

30 RET16-encoding sequence and a nucleic acid encoding 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 52 -

residues facilitate purification on IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) as described by J. Porath et al., 1992, *Prot. Exp. Purif.*, 3:263-281, while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying from the fusion protein. For a discussion of suitable vectors for fusion protein production, see D.J. Kroll et al., 1993; *DNA Cell Biol.*, 12:441-453.

Human artificial chromosomes (HACs) can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid vector. HACs are linear microchromosomes which can contain DNA sequences of 10K to 10M in size, and contain all of the elements that are required for stable mitotic chromosome segregation and maintenance (See, J.J. Harrington et al., 1997, *Nature Genet.*, 15:345-355). HACs of 6 to 10M are constructed and delivered via conventional delivery methods (e.g., liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles) for therapeutic purposes.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the RET16 polypeptide using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein are known and practiced in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive with two non-interfering epitopes on the RET16 polypeptide is preferred, but a competitive binding assay can also be employed. These and other assays are described in the art as represented by the publication of R. Hampton et al., 1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN and D.E. Maddox et al., 1983; *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216).

Anti-Human RET16 Antibodies and Uses Thereof

Purified RET16 protein, or fragments thereof, can be used to produce antibodies, or to screen libraries of pharmaceutical agents or other compounds, particularly, small molecules, to identify those which specifically bind RET16. Such antibodies can be useful as antagonists or inhibitors of

- 53 -

the RET16 polypeptide of the present invention and can be polyclonal, monoclonal, or recombinantly produced.

Antibodies specific for the RET16 polypeptide, or immunogenic peptide fragments thereof, can be generated using methods that have long
5 been known and conventionally practiced in the art. Such antibodies can include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and fragments produced by an Fab expression library. Neutralizing antibodies, (i.e., those which inhibit dimer formation) are especially preferred for therapeutic use.

10 For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, sheep, rats, mice, humans, and others, can be immunized by injection with RET16 polypeptide, or any peptide fragment or oligopeptide thereof, which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological
15 response. Nonlimiting examples of suitable adjuvants include Freund's (incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide or silica, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Adjuvants typically used in humans include BCG (bacilli Calmette Guérin) and *Corynebacterium*
20 *parvum*.

Preferably, the peptides, fragments, or oligopeptides used to induce antibodies to RET16 polypeptide (i.e., immunogens) have an amino acid sequence having at least five amino acids, and more preferably, at least 7-
25 10 amino acids. It is also preferable that the immunogens are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein; they can also contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring molecule. The peptides, fragments or oligopeptides can comprise a single epitope or antigenic determinant or multiple epitopes. Short stretches of RET16 amino acids can be fused with those of another protein, such as
30 KLH, and antibodies are produced against the chimeric molecule.

Monoclonal antibodies to RET16 polypeptide, or immunogenic fragments thereof, can be prepared using any technique which provides for

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 54 -

the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (G. Kohler et al., 1975, *Nature*, 256:495-497; D. Kozbor et al., 1985, *J. Immunol. Methods*, 81:31-42; R.J. Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030; and S.P. Cole et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 62:109-120). The production of monoclonal antibodies is well known and routinely used in the art.

- In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (S.L. Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855; M.S. Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; and S. Takeda et al., 1985, *Nature*, 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted, using methods known in the art, to produce RET16 polypeptide-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (D.R. Burton, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11120-3). Antibodies can also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (R. Orlandi et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837 and G. Winter et al., 1991, *Nature*, 349:293-299).
- Antibody fragments which contain specific binding sites for the RET16 polypeptide can also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments.
- Alternatively, Fab expression libraries can be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (W.D. Huse et al., 1989, *Science*, 254.1275-1281).

- 55 -

Various immunoassays can 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 measuring the formation of complexes between the RET16 polypeptide and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive with two non-interfering RET16 polypeptide epitopes is preferred, but a competitive binding assay can also be employed (Maddox, *supra*).

10 Therapeutics/Treatments

In an embodiment of the present invention, the polynucleotide encoding the RET16 polypeptide, or any fragment or complement thereof, can be used for therapeutic purposes. In one aspect, antisense to the polynucleotide encoding the RET16 polypeptide can be used in situations in which it would be desirable to block the transcription of RET16 mRNA. In particular, cells can be transformed or transfected with sequences complementary to polynucleotides encoding the RET16 polypeptide, as described in Example 4 herein. Thus, complementary molecules can be used to modulate human RET16 polynucleotide and polypeptide activity, or to achieve regulation of gene function. Such technology is now well known in the art, and sense or antisense oligomers or oligonucleotides, or larger fragments, can be designed from various locations along the coding or control regions of polynucleotide sequences encoding the RET16 polypeptide.

25 Expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids can be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue or cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors which will express nucleic acid sequence that is complementary to the nucleic acid sequence encoding the RET16

30

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 56 -

polypeptide. These techniques are described both in J. Sambrook et al., *supra* and in F.M. Ausubel et al., *supra*.

The gene encoding the RET16 polypeptide can be turned off by transforming a cell or tissue with an expression vector that expresses high levels of a RET16 polypeptide-encoding polynucleotide, or a fragment thereof. Such constructs can be used to introduce untranslatable sense or antisense sequences into a cell. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors can continue to transcribe RNA molecules until they are disabled by endogenous nucleases. Transient expression can last for a month or more with a non-replicating vector, and even longer if appropriate replication elements are designed to be part of the vector system.

Modifications of gene expression can be obtained by designing antisense molecules or complementary nucleic acid sequences (DNA, RNA, or PNA), to the control, 5', or regulatory regions of the gene encoding the RET16 polypeptide, (e.g., signal sequence, promoters, enhancers, and introns). Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, e.g., between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. 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 (See, for example, J.E. Gee et al., 1994, In: B.E. Huber and B.I. Carr, *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY). The antisense molecule or complementary sequence can also be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Ribozymes, i.e., enzymatic RNA molecules, can 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. Suitable examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 57 -

can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of sequences encoding the RET16 polypeptide.

Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include 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 can be evaluated for secondary structural features which can render the oligonucleotide inoperable. The suitability of candidate targets can also be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays.

Complementary ribonucleic acid molecules and ribozymes according to the invention can be prepared by any method known in the art for the synthesis of nucleic acid molecules. Such methods include techniques for chemically synthesizing oligonucleotides, for example, solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules can be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding human RET16. Such DNA sequences can be incorporated into a wide variety of vectors with suitable RNA polymerase promoters such as T7 or SP. Alternatively, the cDNA constructs that constitutively or inducibly synthesize complementary RET16 RNA can be introduced into cell lines, cells, or tissues.

RNA molecules can 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.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 58 -

Many methods for introducing vectors into cells or tissues are available and are equally suitable for use *in vivo*, *in vitro*, and *ex vivo*. For *ex vivo* therapy, vectors can be introduced into stem cells taken from the patient and clonally propagated for autologous transplant back into that same patient. Delivery by transfection and by liposome injections can be achieved using methods which are well known in the art.

In another embodiment of the present invention, an expression vector containing the complement of the polynucleotide encoding the RET16 polypeptide, or an antisense oligonucleotide, can be administered to an individual to treat or prevent an inflammatory disease or disorder and/or a disease or disorder associated with uncontrolled cell growth, hyperactivity or stimulation. A variety of specialized oligonucleotide delivery techniques can be employed, for example, encapsulation in unilamellar liposomes and reconstituted Sendai virus envelopes for RNA and DNA delivery (Arad et al., 1986, *Biochem. Biophys. Acta.*, 859:88-94).

In another embodiment, the proteins, antagonists, antibodies, agonists, complementary sequences, or vectors of the present invention can be administered in combination with other appropriate therapeutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can 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.

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

30 Screening Methods

The RET16 protein and nucleic acid can be used in screening assays of candidate bioactive agents that modulate RET16 bioactivity, for potential

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 59 -

use to treat inflammation disorders, for example, such as those involving activated and/or hyperactive cells, e.g., T-cells, B-cells, endothelial cells, macrophages, neutrophils, mast cells and eosinophils. In addition, RET16 protein and encoding nucleic acid, as well as the bioactive agents that modulate RET16 activity or function, can be used as effectors in methods to regulate cell activation.

RET16 polynucleotide and polypeptide can also be modulated by interactive molecules. By "modulate" herein is meant that the bioactivity of RET16 is altered, i.e., either increased, augmented, or enhanced, such as by agonists; or decreased, inhibited, or blocked, such as by antagonists. In a preferred embodiment, RET16 bioactivity is inhibited. Because RET16 is expressed in cells stimulated by TNF-alpha, which is a factor involved in inflammatory responses, and is a candidate ubiquitin ligase; it can play a role in intracellular signaling, or it can serve as part of the master switch for the development of inflammatory processes. Accordingly, RET16 can be used as a target to screen for antagonists or inhibitors of its function or expression in the cell signaling cascade.

In another embodiment of the present invention, RET16 proteins and nucleic acids are used in screening assays to identify and detect candidate bioactive agents that modulate RET16 bioactivity, for potential use to treat diseases which can be caused by hyperactivated B and/or T cells, e.g., autoimmune disease, as well as to treat inflammatory diseases involving cells which produce cytokines and factors that promote, accelerate, or exacerbate inflammation, e.g., leukocytes, mast cells, natural killer cells, neutrophils, macrophages, eosinophils, polymorphonuclear leukocytes, and the like, or cell damage in a variety of body tissues. Nonlimiting examples of inflammatory diseases in which the master switch of the intracellular signaling cascade can be upregulated, stimulated, or otherwise involved include arthritis (both rheumatoid and juvenile); psoriasis; asthma; ischemia-reperfusion; rejection of organ or tissue transplants; chronic obstructive pulmonary disease; inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis; inacute respiratory distress syndrome; systemic lupus

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 60 -

erythematosis, multiple sclerosis and cystic fibrosis. Other diseases or disorders in which bioactive agents which modulate RET16 can be used include autoimmune diseases, cancers, tumors and neoplasms and other diseases related to uncontrolled cell growth, in a variety of tissues, especially those in which RET16 has been found to be expressed. (See, for example, FIGS. 7A-7D).

Generally, in performing such screening methods, RET16 polypeptide is non-diffusably bound to an insoluble support having isolated sample receiving areas (e.g. a microtiter plate, an array, etc.). The criteria for suitable insoluble supports are that they can be made of any composition to which polypeptides can be bound, they are readily separated from soluble material, and they are otherwise compatible with the overall method of screening. The surface of such supports can be solid or porous and of any convenient size or shape. Examples of suitable insoluble supports include microtiter plates, arrays, membranes and beads. These are typically made of glass, plastic (e.g., polystyrene), polysaccharides, nylon or nitrocellulose. Microtiter plates and arrays are especially convenient, because a large number of assays can be carried out simultaneously, using small amounts of reagents and samples. The particular manner of binding the polypeptide is not crucial, so long as it is compatible with the reagents and overall methods of the invention, maintains the activity of the peptide and is nondiffusable.

Preferred methods of binding include the use of antibodies (which should not hinder the binding of RET16 to its associated proteins), direct binding to "sticky" or ionic supports, chemical crosslinking, etc. Following binding of the polypeptide, excess unbound material is removed by washing. The sample receiving areas can then be blocked as needed through incubation with bovine serum albumin (BSA), casein or other innocuous/nonreactive protein.

A candidate bioactive agent is added to the assay. Novel binding agents include specific antibodies, non-natural binding agents identified in screens of chemical libraries, peptide analogs, etc. Of particular interest are screening assays for agents that have a low toxicity for human cells. A wide

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 61 -

variety of assays can be used for this purpose, including labeled *in vitro* protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shift assays, immunoassays for protein binding, and the like. The term "agent" as used herein describes any molecule, e.g., protein, oligopeptide, small organic molecule, polysaccharide, polynucleotide, etc., having the capability of directly or indirectly altering the bioactivity of RET16 proteins. Generally a plurality of assay mixtures are run in parallel with different agent concentrations to obtain a differential response to the various concentrations. Typically, one of these concentrations serves as a negative control, i.e., at zero concentration, or below the level of detection.

Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 100 and less than about 10,000 daltons, preferably, less than about 2000 to 5000 daltons, as a nonlimiting example. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. In addition, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means. Known pharmacological agents can be subjected

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 62 -

to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification to produce structural analogs.

The determination of the binding of the candidate bioactive agent to the RET16 polypeptide can be accomplished in a number of ways practiced
5 in the art. In one aspect, the candidate bioactive agent is labeled, and binding is determined directly. Where the screening assay is a binding assay, one or more of the molecules can be joined to a label, where the label can directly or indirectly provide a detectable signal. Various labels
10 include radioisotopes, fluorescent and chemiluminescent compounds, specific binding molecules, particles, e.g. magnetic particles, and the like. Specific binding molecules include pairs, such as biotin and streptavidin, digoxin and antidigoxin etc. For the specific binding members, the complementary member would normally be labeled with a molecule which
15 allows detection, in accordance with known procedures. In some embodiments, only one of the components is labeled. Alternatively, more than one component can be labeled with different labels; for example, the RET16 polypeptide can be labeled with one fluorophor and the candidate agent labeled with another

In one embodiment, the candidate bioactive agent is labeled. Labeled
20 candidate bioactive agents are incubated with the RET16 polypeptide for a time sufficient to allow binding, if present. Incubations can be performed at any temperature which facilitates optimal activity, typically between 4°C and 40°C. Incubation periods are selected for optimum activity, but can also be optimized to facilitate rapid high throughput screening. Typically between 0.1
25 and 1 hour is sufficient. Excess reagent is generally removed or washed away. The presence or absence of the labeled component is detected to determine and indicate binding.

A variety of other reagents can be included in the screening assay. Such reagents include, but are not limited to, salts, neutral proteins, e.g.
30 albumin, detergents, etc., which can be used to facilitate optimal protein-protein binding and/or reduce non-specific or background interactions. In addition, reagents that otherwise improve the efficiency of the assay, such

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 63 -

as protease inhibitors, nuclease inhibitors, anti-microbial agents, etc. can be used. Further, the mixture of components in the method can be added in any order that provides for the requisite binding.

5 Kits are included as an embodiment of the present invention which comprise containers with reagents necessary to screen test compounds. Depending on the design of the test and the types of compounds to be screened, such kits include human RET16 polynucleotide or polypeptide and instructions for performing the assay.

10 Enhancement of the Biological Activity/Functional Characteristics of the RET16 Proteins of the Present Invention Through Molecular Evolution

Although many of the most biologically active proteins known are highly effective for their specified function in an organism, they often possess characteristics or traits that make them undesirable for transgenic, 15 therapeutic, pharmaceutical, and/or industrial applications. Among these characteristics or traits, a short physiological half-life is the most prominent problem, and is present either at the level of the protein, or the level of the mRNA of the protein. The ability to extend the half-life, for example, would be particularly important for the use of a protein in gene therapy, transgenic 20 animal production, bioprocessing, production and purification of the protein, and use of the protein as a chemical modulator, among others. Therefore, there is a need to identify novel variants of isolated proteins possessing characteristics which enhance their application as a therapeutic for treating diseases of animal origin, in addition to the applicability of the protein to 25 common industrial and pharmaceutical applications.

Thus, in accordance with an aspect of the present invention is the ability to enhance specific characteristics of the invention, e.g., the RET16 polynucleotides and/or proteins, through directed molecular evolution. Such an enhancement can, as non-limiting examples, benefit the following: the 30 utility of the invention as an essential component in a kit; the physical attributes of the invention, such as its solubility, structure, or codon optimization; the specific biological activity of the invention, including any

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 64 -

associated enzymatic activity, enzyme kinetics of the protein, the K_i , K_{cat} , K_m , V_{max} , K_d of the protein; protein-protein activity; protein-DNA binding activity; antagonist/inhibitory activity (including direct or indirect interaction); agonist activity (including direct or indirect interaction); the antigenicity of the protein (e.g., in which it would be desirable to either increase or decrease the antigenic potential of the protein); the immunogenicity of the protein; the ability of the protein to form dimers, trimers, or multimers with either itself or other proteins; and the antigenic efficacy of the invention, including its subsequent use a preventative treatment for disease or disease states, or as an effector for targeting diseased genes. Moreover, the ability to enhance specific characteristics of a protein can also apply to changing the characterized activity of an enzyme to an activity completely unrelated to its initially characterized activity. Other desirable enhancements of the invention are specific to each individual protein, and would thus be well known in the art and contemplated by the present invention.

For example, an engineered ubiquitin ligase enzyme can be constitutively active upon binding of its substrate. Alternatively, an engineered ubiquitin ligase enzyme can be constitutively active in the absence of substrate binding. In yet another example, an engineered ubiquitin ligase enzyme can be capable of being activated with less than all of the regulatory factors and/or conditions typically required for ubiquitin ligase enzyme activation (e.g., substrate binding, phosphorylation, conformational changes, etc.). Such a ubiquitin ligase enzyme is useful in screens to identify ubiquitin ligase enzyme modulators, among other uses described herein. Alternatively, an engineered ubiquitin ligase enzyme can have altered substrate specificity, and/or enhanced ubiquitin ligase enzyme activity. Alternatively, an engineered ubiquitin ligase enzyme can have decreased ubiquitin ligase enzyme activity.

Directed evolution is comprised of several steps. The first step establishes a library of variants for the gene or protein of interest. The most important step is then to select for those variants that entail the activity to be identified. The design of the screen is essential, since the screen should be

- 65 -

selective enough to eliminate non-useful variants, but not so stringent as to eliminate all variants. The last step is then to repeat the above steps using the best variant from the previous screen. Each successive cycle can then be tailored as necessary, such as increasing the stringency of the screen,
5 for example.

A variety of reaction conditions can be utilized to carry out the DNA shuffling reaction. However, specific reaction conditions for DNA shuffling are provided, for example, as described in *PNAS/USA*, 91:10747, (1994). Briefly: the DNA substrate to be subjected to the DNA shuffling reaction is
10 prepared. The preparation can be in the form of simply purifying the DNA from contaminating cellular material, chemicals, buffers, oligonucleotide primers, deoxynucleotides, RNAs, etc., and can entail the use of DNA purification kits, such as those provided by Qiagen, Inc., or by Promega, Corp., for example.

Once the DNA substrate has been purified, it is subjected to Dnase I digestion. About 2-4 μg of the DNA substrate(s) are digested with 0.0015 units of Dnase I (Sigma) per μl in 100 μl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 / 1 mM MgCl_2 for 10-20 minutes at room temperature. The resulting DNA fragments
15 of 10-50 bp are then purified by subjecting them to electrophoresis through a low-melting point agarose gel (2%) and/or onto DE81 ion-exchange paper (Whatman). Alternatively, the DNA fragments can be purified using Microcon concentrators (Amicon) of the appropriate molecular weight cutoff, or oligonucleotide purification columns (Qiagen) can be used, in addition to
20 other methods known in the art. If using DE81 ion-exchange paper, the 10-50 bp fragments can be eluted from the paper using 1 M NaCl, followed by ethanol precipitation.

The resulting purified fragments are then subjected to a PCR assembly reaction by re-suspension in a PCR mixture containing: 2 mM of each dNTP, 2.2 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, and 0.1%
30 Triton X-100, at a final fragment concentration of 10-30 ng/ μl . No primers are added at this point. *Taq* DNA polymerase (Promega) is used at 2.5

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 66 -

units per 100 μ l of reaction mixture. A PCR program of 94 C for 60 seconds (s); 94 C for 30s, 50-55 C for 30s, and 72 C for 30s using 30-45 cycles, followed by 72 C for 5 minutes using an MJ Research (Cambridge, MA) PTC-150 thermocycler is used.

5 After the assembly reaction is completed, a 1:40 dilution of the resulting primerless product is then introduced into a PCR mixture (using the same buffer mixture used for the assembly reaction) containing 0.8 μ m of each primer and subjecting this mixture to 15 cycles of PCR (using 94 C for 30s, 50 C for 30s, and 72 C for 30s). The preferred primers are those which
10 correspond to the nucleic acid sequences of the polynucleotide(s) utilized in the shuffling reaction. Such primers can consist of modified nucleic acid base pairs using methods known in the art and referred to elsewhere herein, or can contain additional sequences (i.e., for adding restriction sites, mutating specific base-pairs, etc.). The resulting shuffled, assembled, and
15 amplified product can be purified using methods well known in the art (e.g., Qiagen PCR purification kits) and then subsequently cloned using appropriate restriction enzymes.

Although a number of variations of DNA shuffling have been published to date, such variations would be well understood by the skilled
20 artisan and are encompassed by the invention. The DNA shuffling method can also be tailored to the desired level of mutagenesis using the methods described by Zhao et al. 1997, *Nucl Acid Res.*, 25(6):1307-1308.

As described above, once the randomized pool has been created, it can then be subjected to a specific screen to identify the variant possessing
25 the desired characteristic(s). Once the variant has been identified, DNA corresponding to the variant can then be used as the DNA substrate for initiating another round of DNA shuffling. This cycle of shuffling, selecting the optimized variant of interest, and then re-shuffling, can be repeated until the ultimate variant is obtained. Examples of model screens applied to
30 identify variants created using DNA shuffling technology can be found in the following publications: J. C. Moore et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 272:336-347;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 67 -

F.R. Cross et al., 1998, *Mol. Cell. Biol.*, 18:2923-2931; and A. Cramer et al., 1997, *Nat. Biotech.*, 15:436-438.

DNA shuffling has several advantages. First, it makes use of beneficial mutations. When combined with screening, DNA shuffling allows the discovery of the best mutational combinations and does not assume that the best combination contains all the mutations in a population. Second, recombination occurs simultaneously with point mutagenesis. An effect of forcing DNA polymerase to synthesize full-length genes from the small fragment DNA pool results in a background mutagenesis rate. In combination with a stringent selection method, enzymatic activity has been evolved up to a 16000 fold increase over the wild-type form of the enzyme. In essence, the background mutagenesis yielded the genetic variability on which recombination acted to enhance the activity.

A third feature of recombination is that it can be used to remove deleterious mutations. As discussed above, during the process of the randomization, for every one beneficial mutation, there can be at least one or more neutral or inhibitory mutations. Such mutations can be removed by including in the assembly reaction an excess of the wild-type random-sized fragments, in addition to the random-sized fragments of the selected mutant from the previous selection. During the next selection, some of the most active variants of the polynucleotide/polypeptide/enzyme, should have lost the inhibitory mutations.

Finally, recombination enables parallel processing. This represents a significant advantage, since there are likely to be multiple characteristics that make a protein more desirable (e.g., solubility, activity, etc.). Since it is increasingly difficult to screen for more than one desirable characteristic or trait at a time, other methods of molecular evolution tend to be inhibitory. However, using recombination, it is possible to combine the randomized fragments of the best representative variants for the various traits, and then select for multiple properties at once.

DNA shuffling can also be applied to the polynucleotides and polypeptides of the present invention to decrease their immunogenicity in a

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 68 -

specified host. For example, a particular variant of the present invention can be created and isolated using DNA shuffling technology. Such a variant can have all of the desired characteristics, although it may be highly immunogenic in a host due to its novel intrinsic structure. Specifically, the
5 desired characteristic can cause the polypeptide to have a non-native structure which could no longer be recognized as a "self" molecule, but rather as "foreign", and thus activate a host immune response directed against the novel variant. Such a problem can be overcome, for example, by including a copy of the gene sequence for a xenobiotic ortholog of the
10 native protein with the gene sequence of the novel variant gene in one or more cycles of DNA shuffling. The molar ratio of the ortholog and the novel variant DNAs could be varied accordingly. Ideally, the resulting hybrid variant identified contains at least some of the coding sequence which enabled the xenobiotic protein to evade the host immune system, as well as
15 the coding sequence of the original novel variant that provided the desired characteristics.

Likewise, the present invention encompasses the application of DNA shuffling technology to the evolution of the polynucleotides and polypeptides of the invention, wherein one or more cycles of DNA shuffling include, in
20 addition to the gene template DNA, oligonucleotides coding for known allelic sequences, optimized codon sequences, known variant sequences, known polynucleotide polymorphism sequences, known ortholog sequences, known homolog sequences, additional homologous sequences, additional non-homologous sequences, sequences from another species, and any
25 number and combination of the above.

In addition to the above-described methods, there are a number of related methods that may also be applicable, or desirable, with respect to this aspect in certain cases. Representative among these are the methods discussed in PCT applications WO 98/31700 and WO 98/32845, which are
30 hereby incorporated by reference. Furthermore, related methods can also be applied to the polynucleotide sequences of the present invention for creating ideal variants for use in gene therapy, protein engineering,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 69 -

evolution of whole cells containing the variant, or in the evolution of entire enzyme pathways containing polynucleotides of the invention as described in PCT applications WO 98/13485, WO 98/13487, WO 98/27230, WO 98/31837, and A. Cramer et al., 1997, *Nat. Biotech.*, 15:436-438,

5 respectively.

Additional methods of applying "DNA shuffling" technology to the polynucleotides and polypeptides of the present invention, including their proposed applications, can be found in U.S. Patent No. 5,605,793; PCT Application No. WO 95/22625; PCT Application No. WO 97/20078; PCT Application No. WO 97/35966; and PCT Application No. WO 98/42832. PCT Application No. WO 00/09727 specifically provides methods for applying DNA shuffling to the identification of herbicide selective crops which can be applied to the polynucleotides and polypeptides of the present invention. In addition, PCT Application No. WO 00/12680 provides methods and compositions for generating, modifying, adapting, and optimizing polynucleotide sequences that confer detectable phenotypic properties on plant species. Each of the above are hereby incorporated in their entirety herein for all purposes.

Pharmaceutical Compositions

20 A further embodiment of the present invention embraces physiologically acceptable and pharmaceutically acceptable compositions comprising RET16 nucleic acids, encoded polypeptides, or peptides, antibodies to RET16 polypeptides, or fragments thereof, mimetics, agonists (e.g., activators), or antagonists (e.g., inhibitors) of the RET16 polypeptide or polynucleotide. Also contemplated by this invention is the administration of the pharmaceutical or physiologically acceptable composition, in conjunction with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, or excipient, for any of the above-described therapeutic uses and effects. The compositions can be administered alone or in combination with at least one other agent, such as a stabilizing compound, which can be administered in
30 other sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 70 -

to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs, hormones, or biological response modifiers.

The pharmaceutical compositions for use in the present invention can be administered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, enteral, topical, sublingual, vaginal, or rectal means.

In addition to the active ingredients (i.e., the RET16 nucleic acid or polypeptide, or functional fragments thereof), the pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically acceptable carriers or excipients comprising auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Further details on techniques for formulation and administration are provided in the latest edition of *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained by the combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropyl-methylcellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums, including arabic and tragacanth, and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as cross-linked

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 71 -

polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a physiologically acceptable salt thereof, such as sodium alginate.

Dragee cores can be used in conjunction with physiologically suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which can also contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments can be added to the tablets or dragee coatings for product identification, or to characterize the quantity of active compound, i.e., dosage.

10 Pharmaceutical preparations which can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium stearate, and, optionally, stabilizers.

15 In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances which increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. In addition, suspensions of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection

25 suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyloleate or triglycerides, or liposomes. Optionally, the suspension can also contain suitable stabilizers or agents which increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions.

30 For topical or nasal administration, penetrants or permeation agents that are appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 72 -

The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, e.g., by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes.

5 The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, and the like. Salts tend to be more soluble in aqueous solvents, or other protonic solvents, than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation
10 can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, combined with a buffer prior to use. After the pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. For
15 administration of the RET16 product, such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

Pharmaceutical compositions suitable for use in the present invention include compositions wherein the active ingredients are contained in an effective amount to achieve the intended purpose. The determination of an
20 effective dose or amount is well within the capability of those skilled in the art. For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays, e.g., using neoplastic cells, or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model can also be used to determine the appropriate concentration range and route of
25 administration. Such information can then be used and extrapolated to determine useful doses and routes for administration in humans.

A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient, for example, the RET16 polypeptide, or active fragments thereof, antibodies to the RET16 polypeptide, agonists or antagonists of the RET16
30 polypeptide, which ameliorates, reduces, or eliminates the symptoms or condition. Therapeutic efficacy and toxicity can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g.,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 73 -

ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population). The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, which can be expressed as the ratio, ED₅₀/LD₅₀. Pharmaceutical compositions which exhibit large
5 therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies are used in determining a range of dosages for human use. Preferred dosage contained in a pharmaceutical composition is within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the
10 dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, who will consider the factors related to the individual requiring treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active
15 moiety or to maintain the desired effect. Factors which may be taken into account include the severity of the individual's disease state, general health of the patient, age, weight, and gender of the patient, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. As a general guide, long-acting
20 pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks, depending on half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms (μg), up to a total dose of about 1 gram (g), depending upon the route of
25 administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and is 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, and the
30 like.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 74 -

Assays and Diagnostics

In another embodiment of the present invention, antibodies which specifically bind to the RET16 polypeptide can be used for the diagnosis of conditions or diseases characterized by expression (or overexpression) of the RET16 polynucleotide or polypeptide, or in assays to monitor patients being treated with RET16 polypeptide, or its agonists, antagonists, or inhibitors. The antibodies useful for diagnostic purposes can be prepared in the same manner as those described above for use in therapeutic methods. Diagnostic assays for the RET16 polypeptide include methods which utilize the antibody and a label to detect the protein in human body fluids or extracts of cells or tissues. The antibodies can be used with or without modification, and can be labeled by joining them, either covalently or non-covalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules which are known in the art can be used, several of which are described above.

Several assay protocols including ELISA, RIA, and FACS for measuring the RET16 polypeptide are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of RET16 polypeptide expression. Normal or standard values for RET16 polypeptide expression are established by combining body fluids or cell extracts taken from normal mammalian subjects, preferably human, with antibody to the RET16 polypeptide under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation can be quantified by various methods; photometric means are preferred. Quantities of the RET16 polypeptide expressed in subject sample, control sample, and disease samples from biopsied tissues are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

According to another embodiment of the present invention, the polynucleotides encoding RET16 polypeptide can be used for diagnostic purposes. The polynucleotides which can be used include oligonucleotide

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 75 -

sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides can be used to detect and quantify RET16-encoding nucleic acid expression in biopsied tissues in which expression (or under- or overexpression) of RET16 polynucleotide can be correlated with disease.

5 The diagnostic assay can be used to distinguish between the absence, presence, and excess expression of RET16, and to monitor regulation of RET16 polynucleotide levels during therapeutic treatment or intervention.

In a related aspect, hybridization with PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding RET16 polypeptide, or closely related molecules, can be used to identify nucleic acid sequences which encode the RET16 polypeptide. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., about 8 to 10 or 12 or 15 contiguous nucleotides in the 5' regulatory region, or a less specific region, e.g., especially in the 3' coding region, and the stringency of the hybridization or amplification (maximal, high, intermediate, or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding the RET16 polypeptide, alleles thereof, or related sequences.

Probes can also be used for the detection of related sequences, and should preferably contain at least 50%, preferably greater than 80%, of the nucleotides encoding RET16 polypeptide. The hybridization probes of this invention can be DNA or RNA and can be derived from the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or from genomic sequence including promoter, enhancer elements, and introns of the naturally occurring RET16 protein.

Methods for producing specific hybridization probes for DNA encoding the RET16 polypeptide include the cloning of nucleic acid sequence that encodes the RET16 polypeptide, or RET16 derivatives, into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, commercially available, and can 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 can be labeled by a

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 76 -

variety of detector/reporter groups, e.g., radionuclides such as ³²P or ³⁵S, or enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/ biotin coupling systems, and the like.

5 The polynucleotide sequence encoding the RET16 polypeptide can be used in Southern or Northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; or in dip stick, pin, ELISA or chip assays utilizing fluids or tissues from patient biopsies to detect the status of, e.g., levels or overexpression of RET16, or to detect altered RET16
10 expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art.

In a particular aspect, the nucleotide sequence encoding the RET16 polypeptide can be useful in assays that detect activation or induction of various inflammatory disease, neoplasms or cancers, particularly those mentioned *supra*. The nucleotide sequence encoding the RET16
15 polypeptide can 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 biopsied or extracted sample is significantly
20 altered from that of a comparable control sample, the nucleotide sequence has hybridized with nucleotide sequence present in the sample, and the presence of altered levels of nucleotide sequence encoding the RET16 polypeptide in the sample indicates the presence of the associated disease. Such assays can also be used to evaluate the efficacy of a particular
25 therapeutic treatment regimen in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient.

To provide a basis for the diagnosis of disease associated with expression of RET16, a normal or standard profile for expression is established. This can be accomplished by combining body fluids or cell
30 extracts taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence, or a fragment thereof, which encodes the RET16 polypeptide, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 77 -

hybridization can be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with those from an experiment where a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained from normal samples can be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for disease. Deviation between standard and subject (patient) values is used to establish the presence of disease.

Once disease is established and a treatment protocol is initiated, hybridization assays can be repeated on a regular basis to evaluate whether the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in a normal individual. The results obtained from successive assays can 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 in biopsied tissue from an individual can indicate a predisposition for the development of the disease, or can provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type can 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 nucleic acid sequence encoding the RET16 polypeptide can involve the use of PCR. Such oligomers can be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced from a recombinant source. Oligomers will preferably comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'→3') and another with antisense (3'→5'), employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers can be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

Methods suitable for quantifying the expression of RET16 include radiolabeling or biotinylating nucleotides, co-amplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 78 -

interpolated (P.C. Melby et al., 1993, *J. Immunol. Methods*, 159:235-244; and C. Duplaa et al., 1993, *Anal. Biochem.*, 229-236). The speed of quantifying multiple samples can be accelerated by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions
5 and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantification.

In another embodiment of the present invention, oligonucleotides, or longer fragments derived from the RET16 polynucleotide sequence described herein, can be used as targets in a microarray. The microarray can be used to monitor the expression level of large numbers of genes
10 simultaneously (to produce a transcript image), and to identify genetic variants, mutations and polymorphisms. This information can be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disease, to diagnose disease, and to develop and monitor the activities of therapeutic agents. In a particular aspect, the microarray is prepared and used
15 according to the methods described in WO 95/11995 (Chee et al.); D.J. Lockhart et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680; and M. Schena et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:10614-10619). Microarrays are further described in U.S. Patent No. 6,015,702 to P. Lal et al.

In another embodiment of this invention, the nucleic acid sequence
20 which encodes the RET16 polypeptide can also be used to generate hybridization probes which are useful for mapping the naturally occurring genomic sequence. The sequences can be mapped to a particular chromosome, to a specific region of a chromosome, or to artificial chromosome constructions (HACs), yeast artificial chromosomes (YACs),
25 bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions, or single chromosome cDNA libraries, as reviewed by C.M. Price, 1993, *Blood Rev.*, 7:127-134 and by B.J. Trask, 1991, *Trends Genet.*, 7:149-154.

In another embodiment of the present invention, the RET16 polypeptide, its catalytic or immunogenic fragments or oligopeptides thereof,
30 can be used for screening libraries of compounds in any of a variety of drug screening techniques. The fragment employed in such screening can be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 79 -

intracellularly. The formation of binding complexes, between the RET16 polypeptide, or portion thereof, and the agent being tested, can be measured utilizing techniques commonly practiced in the art and as described above.

5 Another technique for drug screening which can be used provides for high throughput screening of compounds having suitable binding affinity to the protein of interest as described in WO 84/03564. In this method, as applied to the RET16 protein, large numbers of different small test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or
10 some other surface. The test compounds are reacted with the RET16 polypeptide, or fragments thereof, and washed. Bound RET16 polypeptide is then detected by methods well known in the art. Purified RET16 polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. Alternatively, non-neutralizing
15 antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on a solid support.

Other screening and small molecule (e.g., drug) detection assays which involve the detection or identification of small molecules that can bind to a given protein, i.e., the RET16 protein, are encompassed by the present
20 invention. Particularly preferred are assays suitable for high throughput screening methodologies. In such binding-based screening or detection assays, a functional assay is not typically required. All that is needed is a target protein, preferably substantially purified, and a library or panel of compounds (e.g., ligands, drugs, small molecules) to be screened or
25 assayed for binding to the protein target. Preferably, most small molecules that bind to the target protein will modulate activity in some manner, due to preferential, higher affinity binding to functional areas or sites on the protein.

An example of such an assay is the fluorescence based thermal shift assay (3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, PA) as described
30 in U.S. Patent Nos. 6,020,141 and 6,036,920 to Pantoliano et al.; see also, J. Zimmerman, 2000, *Gen. Eng. News*, 20(8)). The assay allows the detection of small molecules (e.g., drugs, ligands) that bind to expressed,

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 80 -

and preferably purified, RET16 polypeptide based on affinity of binding determinations by analyzing thermal unfolding curves of protein-drug or ligand complexes. The drugs or binding molecules determined by this technique can be further assayed, if desired, by methods, such as those
5 described herein, to determine if the molecules affect or modulate function or activity of the target protein.

In a further embodiment of this invention, competitive drug screening assays can be used in which neutralizing antibodies capable of binding RET16 polypeptide specifically compete with a test compound for binding to
10 RET16 polypeptide. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with the RET16 polypeptide.

Transgenics and Knock Outs

The present invention further encompasses transgenic non-human mammals, preferably mice, that comprise a recombinant expression vector harboring a nucleic acid sequence that encodes human RET16 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.
15

Transgenic non-human mammals useful to produce recombinant proteins are well known to the skilled practitioner, as are the expression
20 vectors necessary and the techniques for generating transgenic animals. Generally, the transgenic animal comprises a recombinant expression vector in which the nucleotide sequence that encodes human RET16 is operably linked to a tissue specific promoter whereby the coding sequence is only expressed in that specific tissue. For example, the tissue specific
25 promoter can be a mammary cell specific promoter and the recombinant protein so expressed is recovered from the animal's milk.

The transgenic animals, particularly transgenic mice, containing a nucleic acid molecule which encodes human RET16 can be used as animal models for studying *in vivo* the overexpression of RET16 and for use in drug
30 evaluation and discovery efforts to find compounds effective to inhibit or modulate the activity of RET16, such as for example compounds for treating inflammatory disorders, diseases, or conditions. One having ordinary skill in

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 81 -

the art using standard techniques, such as those taught in U.S. Patent No. 4,873,191, issued Oct. 10, 1989 to Wagner and in U.S. Patent No. 4,736,866, issued April 12, 1988 to Leder, can produce transgenic animals which produce human RET16, and use the animals in drug evaluation and
5 discovery projects.

Another aspect of the present invention relates to knock-out mice and methods of using the same. In particular, transgenic mice can be generated which are homozygous for a mutated, non-functional RET16 gene which is introduced into the animals using well known techniques. The knock-out
10 mice produce no functional RET16 and thus are useful to study the function of RET16. Furthermore, the mice can be used in assays to study the effects of test compounds in RET16 deficient animals. For instance, RET16-deficient mice can be used to determine if, how and to what extent RET16 inhibitors will effect the animal and thus address concerns associated with
15 inhibiting the activity of the molecule.

Methods of generating genetically deficient "knock out" mice are well known and are disclosed in M.R. Capecchi, 1989, *Science*, 244:1288-1292 and P. Li et al., 1995, *Cell*, 80:401-411. For example, the mouse (or human) RET16 cDNA clone can be used to isolate a murine RET16 genomic clone.
20 The genomic clone can be used to prepare a RET16 targeting construct which can disrupt the RET16 gene in the mouse by homologous recombination. The targeting construct contains a non-functioning portion of the RET16 gene which inserts in place of the functioning portion of the native mouse gene. The non-functioning insert generally contains an
25 insertion in the exon that encodes the active region of RET16. The targeting construct can contain markers for both positive and negative selection. The positive selection marker allows for the selective elimination of cells which do not carry the marker, while the negative selection marker allows for the elimination of cells that carry the marker.

30 For example, a first selectable marker is a positive marker that will allow for the survival of cells carrying it. In some instances, the first selectable marker is an antibiotic resistance gene, such as the neomycin

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 82 -

resistance gene, which can be placed within the coding sequence of the RET16 gene to render it non-functional, while at the same time rendering the construct selectable. The antibiotic resistance gene is within the homologous region which can recombine with native sequences. Thus, upon homologous recombination, the non-functional and antibiotic resistance selectable gene sequences will be taken up. Knock-out mice can be used as models for studying inflammation-related disorders and screening compounds for treating these disorders.

The targeting construct also contains a second selectable marker which is a negative selectable marker. Cells with the negative selectable marker will be eliminated. The second selectable marker is outside the recombination region. Thus, if the entire construct is present in the cell, both markers will be present. If the construct has recombined with native sequences, the first selectable marker will be incorporated into the genome and the second will be lost. The herpes simplex virus thymidine kinase (HSV tk) gene is an example of a negative selectable marker which can be used as a second marker to eliminate cells that carry it. Cells with the HSV tk gene are selectively killed in the presence of gancyclovir.

Cells are transfected with targeting constructs and then selected for the presence of the first selection marker and the absence of the second. Constructs / DNA are then injected into the blastocyst stage and implanted into pseudopregnant females. Chimeric offspring which are capable of transferring the recombinant genes in their germline are selected, mated and their offspring examined for heterozygous carriers of the recombined genes. Mating of the heterozygous offspring can then be used to generate fully homozygous offspring which constitute RET16-deficient knock-out mice.

Other embodiments of the present invention embrace methods of using the RET16 polynucleotides and encoded polypeptides, fragments thereof, or antibodies thereto. More particularly, such methods include a method of using a polynucleotide sequence to purify a molecule or compound in a sample, where the molecule or compound specifically binds

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 83 -

to the polynucleotide. Such a method comprises combining a RET16 polynucleotide of this invention under conditions to allow specific binding; detecting specific binding between the RET16 polynucleotide and the molecule or compound in the sample; recovering the bound polynucleotide; and separating the polynucleotide from the molecule or compound, thereby obtaining a purified molecule or compound.

Other methods in accordance with the present invention involve the screening for candidate compounds that are capable of modulating the activity of a cell signaling protein, such as RET16, comprising contacting a test compound, e.g., antagonists or agonists, with a cell or tissue that expresses a RET16 protein, or functional fragment thereof, and selecting as candidate modulating compounds those test compounds that modulate activity of the RET16 protein that is involved in the cell signaling cascade. In such a method the RET16 cell signaling cascade protein activity can be its binding to an interacting domain of a second intracellular cell signaling protein.

Another method encompassed by the present invention involves screening for candidate compounds that are capable of binding to a RET16 cell signaling protein or fragment thereof, which includes contacting a test compound with (i) a cell or tissue expressing the RET16 cell signaling protein according to the present invention, or (ii) an isolated protein thereof; and selecting test compounds that bind to the RET16 cell signaling protein.

An additional method of this invention is that of screening for compounds to identify those compounds which enhance, increase, or accelerate the binding of a RET16 protein with a second cell signaling protein. Such a method involves contacting the RET16 protein according to the present invention with a second cell signaling molecule with which it binds or associates in the presence or absence of a test compound under conditions which permit binding and determining if the level of binding of the RET16 protein to the second cell signaling molecule is enhanced, increased or accelerated by comparing the level of binding in the presence of the test compound with that in the absence of the test compound. It will be

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 84 -

appreciated that the foregoing methods are particularly suited for performance by high throughput screening.

EXAMPLES

5 The Examples below are provided to illustrate the subject invention and are not intended to limit the invention. The Examples do not include detailed descriptions of conventional methods employed, e.g., the construction of vectors, the insertion of cDNA into such vectors, or the introduction of the resulting vectors into appropriate hosts. Such methods
10 are well known to those having skill in the art and are described in numerous publications, for example, Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Example 1

15

Methods

A. Isolation of the human RET16 full-length ORF coding sequence

A clone containing the predicted coding sequence of RET16 was isolated from human microvascular endothelial cells (HMVECs) treated with tumor necrosis factor alpha (TNF α) for 6 hours using reverse
20 transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR). A triple primer set (each at 400 nM final concentration) was used to amplify a 1532 bp sequence using the following conditions:
JNF 346 (5'-TCACCTGCGCGGCACGTGACCC-3'), (SEQ ID NO:17);
JNF 493 (5'-TTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCC-3'), (SEQ ID NO:18);
25 JNF 494 (5'-TTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCCATCTATTGATGGC-3'),
(SEQ ID NO:19) with 200 μ M dNTP's, 1X Advantage 2 Polymerase PCR Buffer, 1X Advantage 2 Polymerase, and 2.0 μ l DNA in 25.0 μ l reaction.
The experiment was cycled 35 times through 94°C for 30 seconds, 68°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes. At the completion of the reaction, 6.0
30 μ l of loading dye was added and the entire reaction was separated by gel electrophoresis in a 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. An ~1.6

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 85 -

kb size band was excised from the gel and purified using the QIAgen gel extraction kit (QIAgen, Valencia, CA). This fragment was ligated into the pTAdv cloning vector (Clontech, Palo Alto, CA) and sequenced using standard methods. Ret16pTAdv_Endo_01 contains a 1532 bp sequence
5 corresponding to the predicted Ret16 coding sequence.

A nucleic acid sequence encoding the RET16 polypeptide was first identified in a subtraction library from TNF-alpha stimulated human lung microvascular endothelial cells (HMVEC). This subtraction clone sequence encoded a 630 bp partial cDNA sequence, SEQ ID NO:5, as shown in FIG.
10 4C. The consensus sequence, SEQ ID NO:1, (FIGS. 1 and 3), was derived from the following overlapping and/or extended nucleic acid sequences: Incyte clones 2552523 (LUNGTUT06), 4632828 (GBLADIT02), 1687704 (PROSTUT10), 2674742 (KIDNNOT19), and public EST clone A1187875 (testis).

15 **B. Identification of a murine RET16 gene ortholog**

To identify the murine ortholog of the human RET16 gene, the coding sequence of huRET16 was used to search against the mouse EST database as described hereinabove. Several murine EST's were identified. They are as follows: AU035693, AA118718, AA204608, W41056,
20 AW146018, AI450495, AI875443, AI316544, AW494796, AW146018 and BE983890. The muRET16 nucleic acid sequence has 80% identity with huRET16. The muRET16 amino acid sequence is 82.5% identical to huRET16 (86.5% similarity). MuRET16 has 7 predicted WD repeats and 1 SAM domain, all with a score >10.

25 **C. Human RET16 gene genomic organization**

A genomic clone was identified containing RET16 gene sequence. Clone hRPK.35_A_1 (GenbankAN AC006501) was used to decipher RET16 exon-intron boundaries. (FIG. 18). RET16 is composed of 11 exon
30 fragments. Exon 1 consists of nucleotides 1-123. Exon 2 consists of nucleotides 124-545. Exon 3 consists of nucleotides 546-730. Exon 4 consists of nucleotides 731-823. Exon 5 consists of nucleotides 824-917. Exon 6 consists of nucleotides 918-951. Exon 7 consists of nucleotides

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 86 -

952-992. Exon 8 consists of nucleotides 993-1099. Exon 9 consists of nucleotides 1100-1279. Exon 10 consists of nucleotides 1280-1420. Exon 11 consists of nucleotides 1421-1810. Exon 11 is followed by a poly A tail. A polyadenylation site (AATAA) is located from 1795-1799. According to
5 AC006501, intron 1 – intron 10 are 3489, 2755, 4123, 3750, 11859, 1824, 80, 1382, 7683, and 12181 nucleotides in length, respectively.

D. HMVEC for cell culture

Primary cultures of human lung microvascular endothelial cells, from a single donor, were obtained from Clonetics (San Diego, CA). The cells
10 were grown according to the protocol provided in the endothelial cell growth medium-2 kit (CC-3202) with 5% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT). The cells were passaged by trypsinization. The cells were first seeded into a T-25 tissue culture flask and after reaching approximately 90%
15 confluence, and then they were passaged into T-225 tissue culture flasks at 1.2×10^6 cells/flask. When the cells had grown to reach approximately 90% confluence, they were passaged and seeded into T-225 flasks at 1.8×10^6 cells/ml. For normal growth conditions, the medium was changed every 48 hours.

E. HMVEC cell treatment for RNA isolation

20 Subconfluent (i.e., 90% confluent) T-225 flasks of HMVEC cells were adjusted to 40 ml of medium per flask by removing medium. Several of the flasks were treated with 10 ng/ml TNF-alpha for 1 hour, 6 hours and 24 hours; other flasks were not treated with TNF-alpha as controls. TNF-alpha-treated cells were compared with untreated cells. The medium was not
25 changed at the time of TNF-alpha addition.

F. RNA isolation

The treated flasks of HMVEC cells were briefly trypsinized (10 ml of trypsin per flask). Trypsinization was terminated by the addition of fetal calf serum to 50% final volume and the flasks were rinsed with PBS, pH 7.4
30 (Gibco, Grand Island, NY). The pooled cells and the PBS rinse from the flasks were pooled and centrifuged ($534 \times g$) for 10 minutes, and the cell pellet was resuspended in PBS and re-centrifuged. The supernatant was

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 87 -

removed and the cell pellet used for RNA isolation. PolyA+ RNA was isolated directly using Fast Track 2.0™ (Invitrogen, Carlsbad, CA).

G. Construction of the subtraction library

The PCR-select cDNA subtraction kit™ (Clontech, Palo Alto, CA) was used to generate a subtraction library from untreated HMVEC poly A+ RNA (tester) and 1 hour TNF-treated HMVEC poly A+ RNA (driver), according to the manufacturer's protocols. Ten secondary PCR reactions were combined and run on a 2% agarose gel. Fragments ranging from approximately 0.3 kb to 10 kb were gel purified using the QIAgen gel extraction kit (QIAgen Inc., Valencia, CA) and inserted into the TA cloning vector, pCR2.1 (Invitrogen). TOP10F' competent *E. coli* (Invitrogen) were transformed and plated on LB plates containing 50 micrograms/ml ampicillin. Clones were isolated and grown in LB broth containing similar concentrations of ampicillin. Plasmids were sequenced according to standard methods.

H. Multiple tissue Northern protocol

Multiple Tissue Northern blots (MTN) were obtained from Clontech (Palo Alto, CA). The MTN's used were human MTN (#7760-1), human MTN II (#7759-1), human MTN III (#7767-1), and human cancer cell line MTN (#7757-1).

Membranes were prehybridized with ExpressHyb hybridization solution (Clontech) for 1 hour at 68°C and then hybridized for 2 hours with a ³²P-labeled probe prepared as follows: The original isolated RET16 subtraction clone was digested using EcoR1 restriction endonuclease (Life Technologies, Gaithersburg, MD). A 540 bp partial cDNA fragment was labeled with ³²P-dCTP using a random primed labeling kit (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN) according to the manufacturer's instructions. Radioactive probe was added at a specific activity of 2x10⁹ counts per minute per milliliter of hybridization solution.

After hybridization, membranes were washed by continuous shaking for 30 minutes with low stringency solution (2 x SSC / 0.05% SDS) at room temperature with 2 changes of solution. Membranes were then washed for

- 88 -

30 minutes with high stringency solution (0.1 x SSC / 0.1% SDS) at 50°C with 1 change of solution. The membranes were exposed with intensifying screens to X-ray film at -70°C for 10 days. (FIGS. 7A-7D).

Example 2

5

Alternative Splice Variants of HuRET16

Two alternative splice forms of RET16 (also called RET16.1 herein), i.e., RET16.2 and RET16.3, have been identified. RET16.2 was identified from human microvascular endothelial cells treated with TNF- α using PCR amplification. Briefly, in an effort to clone the full-length coding sequence of RET16, a second band of lesser size was amplified, in addition to the 1500 bp RET16 amplicon. This second amplicon migrated slightly less than 1300 bp. Both fragments were cloned into pTAdv TA cloning vector and were sequenced. Exon fragments from RET16 were aligned with the second amplicon sequence, called RET16.2, a splice variant of RET16. Four exons were found to be deleted in RET16.2. These exons are exon 5-8 and correspond to WD repeats #6 and #7. The cDNA clone of the RET16.2 splice variant was deposited with the ATCC under Accession No. PTA-3161 on March 7, 2001 under the terms of the Budapest Treaty. Accordingly, the present invention provides the RET16.2 cDNA nucleic acid sequence comprising ATCC Deposit Accession No. PTA-3161.

The second RET16 splice variant (RET16.3) was identified in Incyte clone identification number 3111127 (Incyte Genomics, Palo Alto, CA). Clone 3111127 was sequenced and found to contain an extra exon fragment (9X). This exon is inserted between exon 9 and exon 10. The amino acid sequence of this exon is extremely hydrophobic. An analysis of the RET16.3 variant's amino acid sequence with SEQ-WEB indicated the presence of a transmembrane domain. This extra exon also disrupts the SAM domain. The cDNA clone of the RET16.3 splice variant was deposited with the ATCC under Accession No. PTA-3161 on March 7, 2001 under the terms of the Budapest Treaty. Also in accordance with the present invention

30

- 89 -

is the RET16.3 cDNA nucleic acid sequence comprising ATCC Deposit Accession No. PTA-3161.

A. RET16.2 nucleic acid sequence identification (FIGS. 19A and 19B)

5

As described for human RET16 (RET21.1), a clone containing the predicted coding sequence of Ret16 was isolated from human microvascular endothelial cells (HMVECs) treated with tumor necrosis factor alpha (TNF α) for 6 hours using reverse transcription/polymerase chain reaction (RT/PCR).

10 A triple primer set (each at 400 nM final concentration) was used to amplify a 1532 bp sequence using the following conditions:

JNF 346 (5'-TCACCTGCGCGGCACGTGACCC-3'), (SEQ ID NO:17);

JNF 493 (5'-TTTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCC-3'), (SEQ ID NO:18);

JNF 494 (5'-TTACTTTTGGTGTGTCTCCAGCCATCTATTGATGGC-3'),

15 (SEQ ID NO:19), 200 μ M dNTP's, 1X Advantage 2 Polymerase PCR Buffer,

1X Advantage 2 Polymerase, and 2.0 μ l DNA in 25.0 μ l reaction. The

experiment was cycled 35 times through 94°C for 30 seconds, 68°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes. At the completion of the reaction, 6.0 μ l of loading dye was added and the entire reaction was separated by gel

20 electrophoresis in a 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. In

addition to the 1.6 kb RET16.1 transcript, a 1.3kb RET16.2 transcript was

excised from the gel and purified using the QIAgen gel extraction kit (QIAgen, Valencia, CA). This fragment was ligated into the pTAdv cloning vector (Clontech, Palo Alto, CA) and sequenced using standard methods.

25 The variant RET16.2, (Ret16pTAdv_Endo_03), SEQ ID NO:12, was found

to contain a 1272 bp sequence corresponding to the predicted Ret16 coding sequence, however, analysis of the exon-intron structure revealed a deletion of exons 5-8. The deduced amino acid sequence of RET16.2 is presented in SEQ ID NO:13.

30

- 90 -

B. RET16.3 nucleic acid sequence identification (FIGS. 20A and 20B)

A 5' EST was identified from the Incyte EST database and purchased
5 from Incyte Genomics (Palo Alto, CA). This clone was prepared according
to the manufacturer's protocols and sequenced. Sequences contained
within clone ID 3111127 were found to correspond to RET16, also called
RET16.1; however, an additional fragment was present between exons 9
and 10. This exon is 78 nucleotides long, does not change the reading
10 frame of the sequence and adds an additional 23 amino acid residues to the
protein sequence. This sequence is extremely hydrophobic. The Incyte
3111127 insert is 1908 bp in length. This RET16 variant is termed RET16.3
herein (SEQ ID NO:14) and its deduced amino acid sequence is presented
in SEQ ID NO:15.

15

Example 3**Human RET16 Tissue Expression Analysis by RT-PCR**

To analyze RET16 tissue expression, multiple tissue cDNA panels
were purchased from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA) and used in the
polymerase chain reaction. Briefly, 1.0 microliter of cDNA from each tissue
20 was added to a 24 microliter reaction mixture containing the following
reagents: 0.4 uM of each primer, 200 uM dNTP, 1X Advantage Polymerase
Buffer (Clontech), and 1X Advantage Polymerase (Clontech). Primer
sequences were JNF 232 (5'- GGCAGATGCTAGTCTCAGGG -3'), (SEQ ID
NO:20) and JNF 233 (5'- GGGATTTAACCTTGGTCCTG -3'), (SEQ ID
25 NO:21). The PCR reaction was run for 35 cycles at 94°C for 30 seconds,
63°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The PCR products were
separated by gel electrophoresis on a 2.0% agarose gel, and the DNA was
visualized by ethidium bromide staining. The expression results are shown
in FIG. 11.

- 91 -

Example 4

Transfection of HMVEC Cells

On the day before transfection, HMVEC cells were plated at 3.5×10^5 cells per well in 6-well plates. Cells were incubated in tissue culture flasks at 37°C, in 5% CO₂. This seeding resulted in wells that were 85-95% confluent on the day of transfection. All centrifugations were performed in 15-ml polystyrene tubes (VWR, cat# 21008-212) or 50-ml polystyrene tubes (Costar-Corning, cat# 25339-50). A 10x stock of oligofectin G (Sequitur, Inc., Natick, MA) was first prepared by dilution in OptiMEM I to 25 ug/ml. Next, 12.5 ml of Oligofectin G per ml of OptiMEM I was added. The diluted stock of lipid was allowed to stand at room temperature for 15 minutes.

A 10x stock (1 uM) of each oligomer (Sequitur, Inc.) in OptiMEM I was prepared by adding 10 µl of oligomer per ml of OptiMEM I. Equal volumes of oligomer and lipid 10x solutions were combined, resulting in a 5x mixture. The oligomer and lipid were allowed to complex by incubating at room temperature for 15 minutes. The oligomer/lipid complexes were then diluted to 1x by adding 4 volumes of HMVEC full growth medium (EGM bullet kit media from Clonetics, San Diego, CA), containing 5% FBS. The culture medium was then aspirated from the cells (low passage number HMVEC, Clonetics) and replaced with the appropriate oligomer/lipid complexes (for a 6-well plate, 1.5-2 ml of transfection medium was used per well).

The cells were incubated for 15-18 hours in transfection medium. The cells were then stimulated with 10 ng/ml of TNF-alpha (R&D systems, Minneapolis, MN) for 6 hours by adding the TNF directly to the growth medium. The uptake of oligomers was evaluated by the uptake of a fluorescent oligomer by microscopy. The cell viability was evaluated by performing dead stain analysis (Sequitur, Inc.). The cells were then harvested for RNA isolation and TaqMan analysis.

30

- 92 -

Example 5

Antisense Inhibition of RET16 Gene Expression

In this Example, experiments were performed to determine inhibition of RET16 expression using an antisense oligonucleotides (oligomers or "oligos"). Preferred antisense oligonucleotides are deoxyribonucleotide- or chimeric deoxyribonucleotide/ribonucleotide-based and are provided below. The oligonucleotides were synthesized using chemistry essentially as described in U.S. Patent No. 5,849,902, which is hereby incorporated herein by reference in its entirety.

10 The antisense oligos were as follows:

11587: 5'-UGCACAUGCCGCCAAGGAGCCAUCU-3' (SEQ ID NO:16) and

11590: 5'-GCACUUUACUACGCAGUCCUAGAGA-3'. (SEQ ID NO:22).

The 11587 and 11590 antisense oligonucleotides hybridize not only to RET16 polynucleotide (SEQ ID NO:1), but also to the two RET16 splice

15 variant polynucleotides, namely, RET16.2 (SEQ ID NO:12) and RET16.3 (SEQ ID NO:14).

HMVEC cells were transfected with 100 nM (final concentration) of antisense oligomer (11587) or control oligomer (11591:

AGAGAUCCUGACGCAUCAUUUCACG), (SEQ ID NO:23) complexed with

20 2.5 µg/ml of oligofectin G. Four hours after the start of the transfection, the transfection medium was aspirated from the cells and was replaced with full growth medium, as defined in Example 4. Eighteen hours after the start of transfection, cells were stimulated with TNF-alpha (10 ng/ml) for six hours. After stimulation, the cells were lysed in guanidinium buffer and total RNA
25 was isolated from the lysates.

Example 6

TNF-alpha stimulated HMVEC cells: ELISA detection of E-selectin expression

Cells transfected with antisense oligos (see Example 5) were
30 maintained by the above-described growth conditions (see Example 3) in

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 93 -

24-well plates. The cells were treated with TNF-alpha at 10 ng/ml for 6 hours without a change of medium.

Following the treatment period, the medium was removed, the plates were washed twice with 4°C PBS (Gibco BRL, Grand Island, NY), and the
5 cells were fixed with 0.5% glutaraldehyde in PBS at 4°C for 10 minutes. The plate was then flicked gently to remove fixing solution, and 200 µl of 3% goat serum in PBS containing 20 mM EDTA (blocking buffer) was added. The plate was then flicked and biotinylated anti-E-selectin (R&D Systems, Minneapolis, MN) was added at 0.25 µg/ml in blocking buffer for 1 hour at
10 37°C. The wells were washed four times with cold PBS. Next, 100 µl/well of streptavidin conjugated horse radish peroxidase, (1:4000 dilution), (Vector Labs SA-5004) in blocking buffer was added, followed by incubation for 1 hour at 37°C. The wells were then washed four times in cold PBS.

100 µl of TMB peroxidase color reagent (Sigma T8540) was then
15 added, and at the completion of color development, the reaction was terminated with 100 µl of 1N H₂SO₄. Following transfer of the developed color reagent to a 96-well plate, the OD₄₅₀ was read on a multiwell plate reader.

Example 7

20 Complementary Polynucleotides

Antisense molecules or nucleic acid sequence complementary to the RET16 protein-encoding sequence, or any part thereof, is used to decrease or to inhibit the expression of naturally occurring RET16. Although the use of antisense or complementary oligonucleotides comprising about 15 to 35
25 base-pairs is described, essentially the same procedure is used with smaller or larger nucleic acid sequence fragments. An oligonucleotide based on the coding sequence of RET16 protein, as shown in FIGS. 1 and 4A, or as depicted in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, for example, is used to inhibit expression of naturally occurring RET16. The complementary
30 oligonucleotide is typically designed from the most unique 5' sequence and is used either to inhibit transcription by preventing promoter binding to the

- 94 -

coding sequence, or to inhibit translation by preventing the ribosome from binding to the RET16 protein-encoding transcript.

Using an appropriate portion of the signal and 5' sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, an effective antisense oligonucleotide includes any
5 of about 15-35 nucleotides spanning the region which translates into the signal or 5' coding sequence of the polypeptide as shown in FIG. 2 or FIG. 4. Appropriate oligonucleotides are designed using OLIGO 4.06 software and the RET16 protein coding sequence (SEQ ID NOS:1, 3, and 5). For some purposes, the murine RET16 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:6) or
10 the rat RET16 nucleic acid sequence (SEQ ID NO:8) can be employed.

Example 8

Northern Analysis

Northern analysis is used to detect the presence of a transcript of a gene and involves the hybridization of a labeled nucleotide sequence to a
15 membrane on which RNA from a particular cell or tissue type has been bound (See, J. Sambrook et al., *supra*). Analogous computer techniques using BLAST (S.F. Altschul, 1993, *J. Mol. Evol.*, 36:290-300 and S.F. Altschul et al., 1990, *J. Mol. Evol.*, 215:403-410) are used to search for identical or related molecules in nucleotide databases, such as GenBank or
20 the LIFESEQ database (Incyte Pharmaceuticals). This analysis is much more rapid and less labor-intensive than performing multiple, membrane-based hybridizations. In addition, the sensitivity of the computer search can be modified to determine whether any particular match is categorized as being exact (identical) or homologous.

25 The basis of the search is the product score, which is defined as follows: $(\% \text{ sequence identity} \times \text{maximum BLAST score}) / 100$. The product score takes into account both the degree of similarity between two sequences and the length of the sequence match. For example, with a product score of 40, the match will be exact within a 1-2% error; at 70, the
30 match will be exact. Homologous molecules are usually identified by selecting those which show product scores between 15 and 40, although

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 95 -

lower scores can identify related molecules. The results of Northern analysis are reported as a list of libraries in which the transcript encoding RET16 occurs. Abundance and percent abundance are also reported. Abundance directly reflects the number of times that a particular transcript is represented in a cDNA library, and percent abundance is abundance divided by the total number of sequences that are examined in the cDNA library.

Example 9**Microarrays**

For the production of oligonucleotides for a microarray, SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, for example, is examined using a computer algorithm which starts at the 3' end of the nucleotide sequence. The algorithm identifies oligomers of defined length that are unique to the gene, have a GC content within a range that is suitable for hybridization and lack predicted secondary structure that would interfere with hybridization. The algorithm identifies specific oligonucleotides of 20 nucleotides in length, i.e., 20-mers. A matched set of oligonucleotides is created in which one nucleotide in the center of each sequence is altered. This process is repeated for each gene in the microarray, and double sets of 20-mers are synthesized in the presence of fluorescent or radioactive nucleotides and arranged on the surface of a substrate. When the substrate is a silicon chip, a light-directed chemical process is used for deposition (WO 95/11995, M. Chee et al.).

Alternatively, a chemical coupling procedure and an ink jet device is used to synthesize oligomers on the surface of a substrate. (WO 95/25116, J.D. Baldeschweiler et al.). As another alternative, a "gridded" array that is analogous to a dot (or slot) blot is used to arrange and link cDNA fragments or oligonucleotides to the surface of a substrate using, for example, a vacuum system, or thermal, UV, mechanical, or chemical bonding techniques. A typical array can be produced by hand, or by using available materials and equipment, and can contain grids of 8 dots, 24 dots, 96 dots, 384 dots, 1536 dots, or 6144 dots. After hybridization, the microarray is washed to remove any non-hybridized probe, and a detection device is used

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 96 -

to determine the levels and patterns of radioactivity or fluorescence. The detection device can be as simple as X-ray film, or as complicated as a light scanning apparatus. Scanned fluorescent images are examined to determine degree of complementarity and the relative abundance /
5 expression level of each oligonucleotide sequence in the microarray.

Example 10

Purification of Naturally Occurring RET16 Protein Using Specific Antibodies

10 Naturally occurring or recombinant RET16 polypeptide is substantially purified by immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the RET16 polypeptide, or a peptide derived therefrom. An immunoaffinity column is constructed by covalently coupling anti-RET16 polypeptide
15 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.

Medium containing RET16 polypeptide is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the preferential absorbance of the RET16 polypeptide (e.g., high ionic
20 strength buffers in the presence of detergent). The column is eluted under conditions that disrupt antibody/RET16 polypeptide binding (e.g., a buffer of pH 2-3, or a high concentration of a chaotrope, such as urea or thiocyanate ion), and RET16 polypeptide is collected.

Example 11

Identification of Molecules That Interact with the RET16 Protein

25 RET16 polypeptide, or biologically active fragments thereof, are labeled with ¹²⁵I Bolton-Hunter reagent (Bolton et al., 1973, *Biochem. J.*, 133:529). Candidate molecules previously arrayed in wells of a multi-welled plate are incubated with the labeled RET16 polypeptide, washed, and any
30 wells having labeled RET16 polypeptide-candidate molecule complexes are assayed. Data obtained using different concentrations of the RET16

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 97 -

polypeptide are used to calculate values for the number, affinity and association of the RET16 polypeptide with the candidate molecules.

Another method suitable for identifying proteins, peptides or other molecules that interact with the RET16 polypeptide include ligand binding assays such as the yeast-two hybrid system as described hereinabove.

Example 12

Method of Creating N- and C-terminal Deletion Mutants Corresponding to the RET16.1, RET16.2, or RET16.3 Polypeptides of the Present Invention

10

As described elsewhere herein, the present invention encompasses the creation of N- and C-terminal deletion mutants, in addition to any combination of N- and C-terminal deletions thereof, corresponding to the RET16.1, RET16.2, or RET16.3 polypeptides of the present invention. A number of methods are available to one skilled in the art for creating such mutants. Such methods can include a combination of PCR amplification and gene cloning methodology. Although one of skill in the art of molecular biology, through the use of the teachings provided or referenced herein, and/or as otherwise known in the art as standard methods, could readily create each deletion mutants of the present invention, exemplary methods are described below.

15

Briefly, using the isolated cDNA clones encoding the full-length RET16.1, RET16.2, or RET16.3 polypeptide sequences, appropriate primers of about 15-25 nucleotides derived from the desired 5' and 3' positions of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, or SEQ ID NO:14 can be designed to PCR amplify, and subsequently clone, the intended N- and/or C-terminal deletion mutant. Such primers can comprise, for example, an initiation and stop codon for the 5' and 3' primer, respectively. Such primers can also comprise restriction sites to facilitate cloning of the deletion mutant post amplification. Moreover, the primers can comprise additional sequences, such as, for example, flag-tag sequences, kozac sequences, or other sequences as discussed and/or referenced herein.

20

25

30

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 98 -

Representative PCR amplification conditions are provided below, although the skilled artisan will appreciate that other conditions can be required and can be employed for efficient amplification. A 100 μ l PCR reaction mixture can be prepared using 10 ng of the template DNA (i.e.,
5 cDNA clone of RET16.1, RET16.2, or RET16.3), 200 μ M 4dNTPs, 1 μ M primers, 0.25U Taq DNA polymerase (PE), and standard Taq DNA polymerase buffer. Typical PCR cycling condition are as follows:

20-25 cycles: 45 seconds, 93 degrees
10 2 minutes, 50 degrees
 2 minutes, 72 degrees
1 cycle: 10 minutes, 72 degrees

After the final extension step of PCR, 5U Klenow Fragment can be
15 added and incubated for 15 minutes at 30°C.

Upon digestion of the fragment with the NotI and SalI restriction enzymes, the fragment can be cloned into an appropriate expression and/or cloning vector which has been similarly digested (e.g., pSport1, among others). The skilled artisan will appreciate that other plasmids can be
20 equally substituted, and also can be desirable in certain circumstances. The digested fragment and vector are ligated using a DNA ligase, and then used to transform competent *E. coli* cells using methods described herein and/or otherwise known in the art.

The 5' primer sequence for amplifying any additional N-terminal
25 deletion mutants can be determined by reference to the following formula:

$$(S+(X * 3)) \text{ to } ((S+(X * 3))+25),$$

where 'S' is equal to the nucleotide position of the initiating start codon of the RET16.1, RET16.2, or RET16.3 gene (i.e., SEQ ID NO:1, SEQ ID
NO:12, or SEQ ID NO:14), and 'X' is equal to the most N-terminal amino
30 acid of the intended N-terminal deletion mutant. The first term provides the start 5' nucleotide position of the 5' primer, while the second term provides the end 3' nucleotide position of the 5' primer corresponding to sense strand

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 99 -

of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, or SEQ ID NO:14. Once the corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide sequence can be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5' end of the sequence, for example. As described

5 herein, the addition of other sequences to the 5' primer may be desired and/or used in certain circumstances (e.g., kozac sequences, and the like).

The 3' primer sequence for amplifying any additional N-terminal deletion mutants can be determined by reference to the following formula:

$$(S+(X * 3)) \text{ to } ((S+(X * 3))-25),$$

10 where 'S' is equal to the nucleotide position of the initiating start codon of the RET16.1, RET16.2, or RET16.3 gene (SEQ ID NO:1, 12, or 14), and 'X' is equal to the most C-terminal amino acid of the intended N-terminal deletion mutant. The first term provides the start 5' nucleotide position of the 3' primer, while the second term provides the end 3' nucleotide position

15 of the 3' primer corresponding to the anti-sense strand of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, or SEQ ID NO:14. Once the corresponding nucleotide positions of the primer are determined, the final nucleotide sequence can be created by the addition of applicable restriction site sequences to the 5' end of the sequence, for example. As described herein, the addition of other

20 sequences to the 3' primer may be desired in certain circumstances (e.g., stop codon sequences, etc.). The skilled artisan will appreciate that modifications of the above nucleotide positions can be used for optimizing PCR amplification.

The same general formulas provided above can be used in identifying

25 the 5' and 3' primer sequences for amplifying any C-terminal deletion mutant of the present invention. Moreover, the same general formulas provided above can be used in identifying the 5' and 3' primer sequences for amplifying any combination of N-terminal and C-terminal deletion mutants of the present invention. The skilled artisan will appreciate that modifications

30 of the above nucleotide positions can be employed for optimizing PCR amplification.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 100 -

Alternatively, preferred polypeptides of the present invention comprise polypeptide sequences corresponding to, for example, internal regions of the RET16.1, RET16.2, or RET16.3 polypeptides (e.g., any combination of both N- and C- terminal RET16.1, RET16.2, or RET16.3 polypeptides deletions) of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15. For example, internal regions could be defined by the equation: amino acid NX to amino acid CX, wherein NX refers to any N-terminal deletion polypeptide amino acid of RET16.1, RET16.2, or RET16.3 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15), and where CX refers to any C-terminal deletion polypeptide amino acid of RET16.1, RET16.2, or RET16.3 (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:15). Polynucleotides encoding these polypeptides are also provided. The present invention also encompasses the use of these polypeptides as an immunogenic and/or antigenic epitopes as described elsewhere herein.

15

The contents of all patents, patent applications, published PCT applications and articles, books, references, reference manuals and abstracts cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety to more fully describe the state of the art to which the invention pertains.

20

As various changes can be made in the above-described subject matter without departing from the scope and spirit of the present invention, it is intended that all subject matter contained in the above description, or defined in the appended claims, be interpreted as descriptive and illustrative of the present invention. Many modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings.

25

- 101 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:
- 5 a.) an isolated polynucleotide encoding a cell signaling polypeptide involved in the intracellular signaling cascade, or a functional fragment thereof, said polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 and SEQ ID NO:7;
 - 10 b.) an isolated polynucleotide comprising the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8;
 - 15 c.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling polypeptide involved in the cell signaling cascade, said polypeptide having at least 80% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4;
 - 20 d.) an isolated polynucleotide comprising a nucleic acid sequence having (i) a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8; (ii) a nucleic acid sequence degenerate from the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:8 as a result of genetic code redundancy, or (iii) a complementary nucleic acid sequence thereto;
 - 25 e.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16 polypeptide;
 - f.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 151 to 1575 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 476 of SEQ ID NO:2 minus the start codon;
 - 30 g.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 148 to 1575 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 102 -

- corresponding to amino acids 1 to 476 of SEQ ID NO:2 including the start codon;
- 5 h.) an isolated polynucleotide having a nucleotide sequence at least 82.0% identical to SEQ ID NO:12
- i.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16.2 polypeptide;
- 10 j.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 114 to 1262 of SEQ ID NO:12, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 384 of SEQ ID NO:13 minus the start codon;
- k.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 111 to 1262 of SEQ ID NO:12, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 384 of SEQ ID NO:13 including the start codon;
- 15 l.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16.3 polypeptide;
- m.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 139 to 1641 of SEQ ID NO:14, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 502 of SEQ ID NO:15 minus the start codon;
- 20 n.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 136 to 1641 of SEQ ID NO:14, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 502 of SEQ ID NO:15 including the start codon;
- 25 o.) an isolated polynucleotide encoding a mouse RET16 polypeptide;
- p.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 22 to 1443 of SEQ ID NO:6, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 475 of SEQ ID NO:4 minus the start codon;
- 30 q.) an isolated polynucleotide comprising nucleotides 19 to 1443 of SEQ ID NO:6, wherein said nucleotides encode a polypeptide

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 103 -

corresponding to amino acids 1 to 475 of SEQ ID NO:7 including the start codon;

- 5 r.) the polynucleotide according to any one of (a) through (q), having the nucleic acid sequence of ATCC Accession No. PTA-3161;
- s.) a polynucleotide which is fully complementary to the polynucleotide according to any one of (a) through (r),
- 10 t.) an isolated polynucleotide wherein the complementary nucleic acid sequence hybridizes to either strand of a denatured, double-stranded polynucleotide comprising the nucleic acid sequence selected from any one of (a) through (r) under conditions of moderate or high stringency;
- u.) the polynucleotide according to (t), wherein the conditions of moderate stringency comprise washing in 0.2x SSPE or SSC and 0.2% SDS at a temperature of about 42°C to about 50°C;
- 15 v.) the polynucleotide according to (t), wherein the conditions of high stringency permit hybridization of those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018 M NaCl at about 65°C;
- w.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling polypeptide involved in the cell signaling cascade, said polypeptide having at least 82% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:13;
- 20 x.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling polypeptide involved in the cell signaling cascade, said polypeptide having at least 95% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:15;
- 25 y.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, having at least 68.2% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:12; and
- 30 z.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, having at least 93.1% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:14.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 104 -

2. A composition comprising the polynucleotide according to claim 1.
3. An expression vector containing the polynucleotide according to claim 1.
4. A host cell containing the expression vector according to claim 3.
5. A substantially purified cell signaling protein comprising a polypeptide sequence selected from the group consisting of:
 - 7 a.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4;
 - 10 b.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4;
 - 15 c.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at least 95% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4;
 - 20 d.) an isolated and substantially purified human cell-signaling protein involved in the cell signaling cascade and encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Accession No. PTA-3161;
 - e.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at least 80% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:9;
 - 25 f.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:9;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 105 -

- 5 g.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade and encoded by a polynucleotide having a nucleic acid sequence as set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a nucleic acid sequence degenerate from that of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 as a result of redundancy of the genetic code;
- h.) a substantially purified cell signaling protein having the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO:7 or SEQ ID NO:9;
- 10 i.) an isolated polypeptide comprising amino acids 2 to 476 of SEQ ID NO:2, wherein said amino acids 2 to 476 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:2 minus the start methionine;
- j.) a RET16 variant protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:13;
- 15 k.) an isolated RET16.2 variant protein encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Deposit Accession No. PTA-3161;
- l.) a RET16 variant protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12;
- 20 m.) an isolated polypeptide comprising amino acids 2 to 384 of SEQ ID NO:13, wherein said amino acids 2 to 384 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:13 minus the start methionine;
- n.) a RET16 variant protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:15;
- 25 o.) an isolated RET16.3 variant protein encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Deposit Accession No. PTA-3161;
- p.) a RET16 variant protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:14;
- 30 q.) an isolated polypeptide comprising amino acids 2 to 502 of SEQ ID NO:15, wherein said amino acids 2 to 502 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:15 minus the start methionine;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 106 -

- r.) a RET16 protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:7;
- s.) a RET16 protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:6;
- 5 t.) an isolated polypeptide comprising amino acids 2 to 475 of SEQ ID NO:7, wherein said amino acids 2 to 475 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:7 minus the start methionine;
- u.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at
- 10 least 82% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:13; and
- v.) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade comprising an amino acid sequence having at
- 15 least 95% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:15.
6. A purified antibody which binds specifically to the protein or polypeptide according to claim 5, or an antigenic epitope thereof.
7. A method for producing a protein involved in the cell signaling cascade comprising the steps of:
- 20 a) culturing the host cell according to claim 4 under conditions suitable for the expression of the polypeptide; and
- b) recovering the polypeptide from the host cell culture.
8. A method of detecting a polynucleotide encoding a cell signaling cascade protein, or fragment thereof, in a biological sample, comprising the
- 25 steps of:
- a) hybridizing the polynucleotide according to claim 1 to the nucleic acid material of the biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
- b) detecting the hybridization complex, wherein the presence of
- 30 the complex correlates with the presence of a polynucleotide encoding

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 107 -

ubiquitin conjugating enzyme, or a fragment thereof, in the biological sample.

9. A method of screening a library of molecules or compounds with a polynucleotide encoding a protein involved in the cell signaling cascade to identify at least one molecule or compound therein which specifically binds to the polynucleotide sequence, comprising:

5 a) combining the polynucleotide according to claim 1 with a library of test molecules or compounds under conditions to allow specific binding; and

10 b) detecting specific binding, thereby identifying a test molecule or compound which specifically binds to the polynucleotide sequence.

10. A method of screening for candidate compounds capable of modulating activity of a cell signaling protein involved in the cell signaling cascade, comprising:

15 a) contacting a test compound with a cell or tissue expressing the protein according claim 5; and

20 b) selecting as candidate modulating compounds those test compounds that modulate activity of the protein involved in the cell signaling cascade.

11. A method of treating an inflammation-related disease or disorder in a mammal comprising administration of the protein according to claim 5 in an amount effective to treat the inflammation-related disease or disorder.

12. The method according to claim 11, wherein the disease or disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, juvenile arthritis, psoriasis, asthma, ischemia-reperfusion, multiple sclerosis, rejection of organ or tissue transplants, chronic obstructive pulmonary disease; inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, inacute

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 108 -

respiratory distress syndrome, systemic lupus erythematosus, cystic fibrosis, autoimmune diseases, cancers, tumors and neoplasms.

13. A method of screening for compounds which inhibit or prevent binding of a human cell signaling protein with a second cell signaling protein, comprising:

- 5 (a) contacting the cell signaling protein according to claim 5 with a second cell signaling molecule with which it binds or associates in the presence or absence of a test compound under conditions which permit binding; and
- 10 (b) determining if the level of binding of the cell signaling protein with the second cell signaling molecule is reduced or inhibited by comparing the level of binding in the presence of the test compound with that in the absence of the test compound.

14. A method of identifying compounds that inhibit the phosphorylation of a cell signaling cascade protein by protein kinases, comprising:

- 15 (a) binding the cell signaling cascade protein according to claim 5 to a solid substrate in a reaction buffer containing ^{32}P -gamma-ATP under conditions to allow binding of the cell signaling protein to the substrate;
- 20 (b) adding protein kinase in the presence or absence of a test compound; and
- (c) determining of the presence of the test compound results in a decrease in the amount of ^{32}P label that is incorporated into the cell signaling cascade protein, compared with the level of phosphorylation
- 25 observed in the absence of the test compound to identify a test compound that inhibits phosphorylation of the cell signaling cascade protein.

15. An isolated polynucleotide consisting of a polynucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 109 -

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- a.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16 polypeptide;
 - b.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 151 to 1575 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 476 of SEQ ID NO:2 minus the start codon;
 - c.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 148 to 1575 of SEQ ID NO:1, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 476 of SEQ ID NO:2 including the start codon;
 - d.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16.2 polypeptide;
 - e.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 114 to 1262 of SEQ ID NO:12, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 384 of SEQ ID NO:13 minus the start codon;
 - f.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 111 to 1262 of SEQ ID NO:12, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 384 of SEQ ID NO:13 including the start codon;
 - g.) an isolated polynucleotide having a nucleotide sequence at least 68.2% identical to SEQ ID NO:12
 - h.) an isolated polynucleotide encoding a human RET16.3 polypeptide;
 - i.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 139 to 1641 of SEQ ID NO:14, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 502 of SEQ ID NO:15 minus the start codon;
 - j.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 136 to 1641 of SEQ ID NO:14, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 502 of SEQ ID NO:15 including the start codon;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 110 -

- k.) an isolated polynucleotide consisting of a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 93.1% identical to SEQ ID NO:14
- 5 l.) an isolated polynucleotide encoding a mouse RET16 polypeptide;
- m.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 22 to 1443 of SEQ ID NO:6, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 2 to 475 of SEQ ID NO:4 minus the start codon;
- 10 n.) an isolated polynucleotide consisting of nucleotides 19 to 1443 of SEQ ID NO:6, wherein said nucleotides encode a polypeptide corresponding to amino acids 1 to 475 of SEQ ID NO:7 including the start codon;
- 15 o.) a polynucleotide which is fully complementary to the polynucleotide according to any one of (a) through (n),
- p.) an isolated polynucleotide wherein the complementary nucleic acid sequence hybridizes to either strand of a denatured, double-stranded polynucleotide comprising the nucleic acid sequence selected from any one of (a) through (o) under
- 20 conditions of moderate or high stringency;
- q.) the polynucleotide according to (p), wherein the conditions of moderate stringency comprise washing in 0.2x SSPE or SSC and 0.2% SDS at a temperature of about 42°C to about 50°C;
- 25 r.) the polynucleotide according to (p), wherein the conditions of high stringency permit hybridization of those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 0.018 M NaCl at about 65°C;
- s.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling polypeptide involved in the cell signaling cascade, said
- 30 polypeptide having at least 82% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:13;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 111 -

- 5 t.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, encoding an amino acid sequence of a cell signaling polypeptide involved in the cell signaling cascade, said polypeptide having at least 95% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:15.
- u.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, having at least 68.2% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:12; and
- 10 v.) an isolated and purified polynucleotide, or fragment thereof, having at least 93.1% sequence identity with the sequence of SEQ ID NO:14.
16. A recombinant vector comprising the isolated nucleic acid molecule according to claim 15.
17. A recombinant host cell comprising the recombinant vector according to claim 16.
18. A substantially purified cell signaling protein consisting of a polypeptide sequence selected from the group consisting of:
- 20 a) an isolated polypeptide consisting of amino acids 2 to 476 of SEQ ID NO:2, wherein said amino acids 2 to 476 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:2 minus the start methionine;
- b) a RET16 variant protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:13;
- 25 c) an isolated RET16.2 variant protein encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Deposit Accession No. PTA-3161;
- d) a RET16 variant protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:12;

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 112 -

- e) an isolated polypeptide consisting of amino acids 2 to 384 of SEQ ID NO:13, wherein said amino acids 2 to 384 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:13 minus the start methionine;
- 5 f) a RET16 variant protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:15;
- g) an isolated RET16.3 variant protein encoded by the nucleic acid sequence of ATCC Deposit Accession No. PTA-3161;
- 10 h) a RET16 variant protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:14;
- i) an isolated polypeptide consisting of amino acids 2 to 502 of SEQ ID NO:15, wherein said amino acids 2 to 502 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:15 minus the start methionine;
- 15 j) a RET16 protein encoded by a nucleic acid sequence encoding the protein having an amino acid sequence of SEQ ID NO:7;
- 20 k) a RET16 protein encoded by the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:6;
- l) an isolated polypeptide consisting of amino acids 2 to 475 of SEQ ID NO:7, wherein said amino acids 2 to 475 comprise a polypeptide of SEQ ID NO:7 minus the start methionine;
- 25 m) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade consisting of an amino acid sequence having at least 82% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:13; and
- 30 n) a substantially purified cell signaling protein involved in the cell signaling cascade consisting of an amino acid

WO 02/066494

PCT/US02/05162

- 113 -

sequence having at least 95% sequence identity to the sequence set forth in SEQ ID NO:15.

19. The method according to claim 11, wherein the disease or disorder is selected from the group consisting of: disorders associated with aberrant
5 activation of the TNF- α pathway, disorders associated with aberrant cellular migration, disorders associated with aberrant cellular proliferation, disorders associated with aberrant cellular metastasis, asthma, juvenile idiopathic arthritis, hematogenous metastases of tumor cells, hyperinsulinaemia, diabetes type 2, atherosclerosis, cardiovascular disease, tumour
10 progression, metastasis, colon cancer, Wegener's granulomatosis, stem cell transplantation complications, thalassemia, atherosclerosis, autoimmune disease atherosclerosis, ischemia-reperfusion injury, acute lung injury, rheumatoid arthritis, graft rejection, systemic lupus, coronary artery calcification, ischaemic heart, and allergic inflammation.
- 15 20. An antisense RET16 oligonucleotide which is complementary to a RET16 polynucleotide sequence selected from SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:12, or SEQ ID NO:14.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

1/31

FIG. 1

```

1  gectgttccc  tctgetctgg  gtctccgccc  gggcccgccc  cggcagcttc
51  acctgcccgg  cactgacccc  gcaccgcccg  tgggcacctt  gaaggcggat
101  cccgcccggc  cccgctcccg  caggctgttt  ttcttcaaat  aaagaacatg
151  gtgaaactga  ttcacacatt  agctgatcat  ggtgacgatg  tcaactgctg
201  tgccttctcc  ttttccctct  tggctacttg  ctccctggac  aaaacaatc
251  gcctgtactc  gttacgtgac  tttactgaac  tgccacattc  tccattgaag
301  tttcataact  atgctgtcca  ctgctgtgt  ttctcccctt  caggacatat
351  tttggcctcg  tgttoaacag  atggtaacco  tgtcctatgg  aatactgaaa
401  atggacagat  gctggcagtg  atggaacagc  ctatggcag  cctctgtagg
451  gtttgccagt  tttcccacga  ctcccagtg  ttggcatcag  gggcagctga
501  tggaaactgt  gttttgtgga  atgcacagtc  atacaaatta  tatagatgtg
551  gtagtgttaa  agatggctcc  ttggggcact  gtgcattttc  tctaatgga
601  agcttctttg  tcaactggctc  ctcatgtggt  gatttaacag  tgtgggatga
651  taaaatgagg  tgtctgcata  gtgaaaaagc  acatgatctt  ggaattacct
701  gctgcgattt  ttcttcacag  ccagtttctg  atggagaaca  aggtcttcag
751  ttttttcgac  tggcatcatg  tggctaggat  tgccaaagta  aaatttggat
801  tgtttctttt  acccatatct  taggttttga  attaaaatat  aaaagtacac
851  tgaagtggca  ctgctgcctc  gttctggctt  gtgcttttcc  ccatgatggg
901  cagatgctag  tctcagggtc  agtggataag  tctgtcatag  tatatgatac
951  taatactgag  aatatacttc  acacattgac  tccgcaaccc  aggtatgta
1001  caactgtgtc  ttttgcacct  aatacccttt  taactgtact  tggttcaatg
1051  gacaaaaacg  tgaacatctg  gcaatttgac  ctggaaacac  tttgccaagc
1101  aaggcgcaca  gaacatcagc  tgaagcaatt  taccgaagat  tggtcagagg
1151  aggatgtctc  aacatggctt  tgtgcacaag  atttaaaaga  tcttgttgg
1201  attttcaaga  tgaataacat  tgatggaaaa  gaactgttga  atcttcaaaa
1251  agaaagtctg  gctgatgat  tgaaaattga  atctctagga  ctgcgtagta
1301  aagtgtctg  gaaaattgaa  gagctcagga  ccaaggttaa  atccctttct
1351  tcaggaattc  ctgatgaatt  tatatgtcca  ataaactagag  aacttatgaa
1401  agatccgctc  atcgcctcag  atggctatcc  atatgaaaag  gaagcaatgg
1451  aaaattggat  cagcaaaaag  aaacgtacaa  gtcccatgac  aaacttctgt
1501  cttccttcag  cggtaactac  acccaaatagg  actctgaaaa  tggcctcaa
1551  tagatggctg  gagacacacc  aaaagtaaaa  ttgttgatat  tgtattattt
1601  atattttcag  tcatctcatt  tgaatgatct  ataggtaaat  actaatcaga
1651  cattatataa  agcaaaaacg  gaaaaaggta  aaactcttaa  attttagttac
1701  ctataaaaaa  tgtcaatttt  cattctttaa  aaaacacatg  gacttactat
1751  aaaagccttt  ttgactagtc  gaaaagaatc  ttcagctata  tagaataaaa
1801  gttatacttt  aaaaaaaaa

```

FIG. 2

1 MVKLIHTLAD HGDDVNCCAF SFSLLATCSL DKTIRLYSLR
41 DFTELEPHSPL KFHTYAVHCC CFSPSGHILA SCSTDGTTVL
81 WNTENGQMLA VMEQPSGSPV RVCQFSPDST CLASGAADGI
121 VVLWNAQSYK LYRCGSVKDG SLAACAFSPN GSFFVTGSSC
161 GDLTVWDDKM RCLHSEKAHD LGITCCDFSS QPVSDGRQGL
201 QFFRLASCGQ DCQVKIWIVS FTHILGFELK YKSTLSGHCA
241 FVLACAFSHD GQMLVSGSVD KSVIVYDTNI ENILHLLTQH
281 TRYVITCAFA PNTLLLATGS MDKTVNIWQF DLETLQARR
321 TEHQLKQFTE DWSEEDVSTW LCAQDLKDLV GIFKMNNDG
361 KELLMLTKES LADDLKIESL GLRSKVLRKI EELRTKVKSL
401 SSGIPDBFIC PITRELMKDP VIASDGYSYE KEAMENWISK
441 KKRTSPMNL VLPSAVLTPN RTLKMAINRW LETHQK

FIG. 3

atggtagaactgattccacattagctgatcatggtagcagatgtcaactgctgtgccttc
M V K L I H T L A D H G D D V N C C A F
tcctttccctcttggctacttgcctcctggacaaaaaattccctgactcgttaact
S F S L L A T C S L D K T I R L Y S L R
gactttactgaactgcccacatttccattgaagttccatacctatgctgtccactgctgc
D F T S L F H S P L K F H T Y A V H C C
tgcttctccctcaggacatattttggcatcgtgttccacagatggaccactgctccta
C F S P S G H I L A S C S T D G T T V L
tggatactgaaaatggacagatgctggcagtgatggaacagcctagtggcagccctgtg
H N T E N G Q N L A V H E Q P S G S P V
agggttgcaagtttccacagactccagtggttggcatcaggggcagctggtggaact
R V C Q F S P D S T C L A S S A A D G T
tggttttgggaatgcaagctcatcaaatatagatggtgtagtgttaagatggc
V V L W N A Q S Y K L Y R C G S V K D G
tccttggggcagctgctattttctcctaattggaagctcttctgctcactggctcctcagt
S L A A C A F S P N G S F F V T G S S C
ggtagtttaacagtggtggatgataaaatgaggtgtctgcatagtgaaaaagccatgat
G D L T V W D D K M R C L H S E K A H D
ctggaaattacctgctgctgatttttctccacagcagtttctgagggagaacaaggtctt
L G I T C C D F S S Q P V S D G E O G L
cagtttttccagctggcatcagtggtcaggattgccaagtcaaaattggattgtttct
Q F F R L A S C G Q D C Q V K I W I V S
ttaccatactcttaggttttgaattaaaataaaaagtacactgagtgggcactgtgct
F T H I L G F E L K Y K S T L S G H C A
cctgttctggcttctgcttttccatgatgggcagatgctagtctcagggctcagtgat
P V L A C A F S H D G Q M L V S G S V D
aagctgctcagatgatgatgataactgagaataacttccacattgactcagcac
K S V I V Y D T N T E N I L H T L T Q H
accaggtatgtcacacttggcttttgcacctaaacccttttactgctactggttca
T R Y V T T C A F A P N T L L L A T G S
atggacaaaacagtgaaactctggcaatttgacctggaacacttggcaagcaaggcgc
M D K T V N I W Q F D L E T L C Q A R R
acagaacatcagctgaagcaattaccgaagattggctcagaggaggatgtctcaacatgg
T E H Q L K Q F T E D W S E E D V S T W
cttggcacaagatttaaaagattctgttggtattttcaagatgaataacattgatgga
L C A Q D L K D L V G I F K M N N I D G
aaagaactgttgaatttcaaaaagaagctcggctgatgattgaaaattgaatctcta
K E L L N L T K E S L A D D L K I E S L
ggactgctagtaagtgctgaggaattgaaagctcaggaccaaggttaaatccctt
G L R S K V L R K I E E L R T K V K S L
cttccagaaattcctgatgaatttatatgtccaataactagagaacttatgaaagatccg
S S G I P D E P I C P I T R E L M K D P
gtcctcagatcagctgctattcatalgaaaaggaagcaatggaaaattggatcagcaaa
V I A S D G Y S Y E K E A M E N W I S K
aagaaactcacaagctccatgacaaatctgttcttccctcagcggctactacacaaat
K K R T S P M T N L V L P S A V L T P N
aggactctgaaaatggccatcaatagatggctggagacacacaaaagtaa
R T L K M A I N R W L E T H Q K

FIG. 4A

gaattcggctttcaacctgctggcggcactgacccgcaccccccgtgggacottg
aaggcggatcccgccgccccccgctcctgcaggctgtttttctcaaataaaga
acatgggtgaaactgattcacacattagctgatcatgggtgacgatgtcaactgct
gtgcttctccttttccctcttggctaacttgctccttggacaaaaacaattcgcc
tgtactcgttacgtgactttactgaaactgccacattctccattgaaagtttcata
cctatgctgtccactgctgctgtttctcccttcaggacatattttggcatcgt
gttcaacagatgggtaccactgctcctatggaatactgaaaaatggacagatgctgg
cagtgatggaacagcctagtgccagccctgtgagggtttgcccagttttcccag
actccacgtgtttggcatcaggggcagctgatggaactgtggtttgtggaatg
cacagtcatacaaatatataagatgtggtagtgttaaagatggctccttggcgg
catgtgcattttctcctaataaggagcttcttgtcactggctcctcatgtggtg
atttaacagtggtgggatgataaaatgaggtgtctgcactgtaaaaagcactg
atcttgaattacctgctgcgattttcttcaacgocagtttctgatggagaac
aaggtcttcagtttttctgactggcatcatgtggtcaggattgccaagtcaaaa
tttggattgtttcttttaccatctcttaggttttgaattaaaaataaaaagta
cactgagtgggcactgtgctcctgttctggcttctgcttttcccgatgagggc
agatgctagtctcagggtcagtgataagctgtcatagtatatgataactaata
ctgagaatatacttcaacattgactcagcacaccaggtatgtcaaacctgtg
cttttgacctaataacccttttacttctactggttcaatggacaaaacagtga
acatctggcaatttgacctggaacactttgccaagcaaggcgcacagaacatc
agctgaagcaatttaccgaagattggtcagaggaggatgtctcaacatggcttt
gtgcacaagattttaaagatctgttgggtatttcaagatgaataacatgatg
gaaaagaactgttgaatcttcaaaaagaaagctctggctgatgatttgaaaattg
aabctctaggactgctgtgtaagtgctgaggaataatgaaagctcaggaccca
aggttaaatcccttctttaggaattcctgalgaatttatatgtccaataacta
gagaacttatgaaagatccggtcatcgcacacagatggctattcataatgaaaagg
aagcaatggaaaattggatcagcaaaaagaaacgtacaagtcctcagcaaatc
ttgttctccttcagcggtacttaccacaaataggactctgaaaatggccatca
atagatggctggagacacccaaaagtaaaaagccgaattc
(1532 bp)

WO 02/066494

PCT/US02/05162

5/31

FIG. 4B

IRLSPARHVTRTARGHLEGGSRAPPLQAVFLQIKNMVKLIHTLADHGDDVNCAPFS
FSLJLATCSLDKTIIRLYSLRDFTELPSPKFKHTYAVHCCCFSPSGHILASCSTDGTT
VLWNTENGQMLAVMEQPSGSPVRVCQFSPDSTCLASGAADGTVVLWNAQSYKLYRCG
SVKDGSLAACAFSPNGSFFVTGSSCGDLTWDDKMRCLHSEKAHDLGITCCDFSSQP
VSDGEQGLQFFRLASCGQDCQVKIWIIVSFTHILGFELKYKSTLSGHCAVLAFAFSR
DGQMLVSGSVDKSVI VYDINTENILHTLTQHTRYVTTCAFAPNTLLLATGSMKTVN
IWQFDLETLCQARRTEHQLKQFTEDWSEEDVSTWLCAQDLKDLVGIKMNNDGKEL
LNLTKESLADDLKISSLGLRSKVLRKIEELRTKVKSLSSGIPDEFICPITRELMKDF
VIASDCYSYEKAMENWISKKRTPMTNLVLPVAVLTPNRTLKMAINRWLETHQK.

WO 02/066494

PCT/US02/05162

6/31

FIG. 4C

```
1  acactgagtg ggcactgtgc tcctgttctg gcttgtgctt tttcccatga
51  tgggcagatg ctagtctcag ggtcagtggg taagtctgtc atagtatatg
101 atactaatac tgagaatata cttcacacat tgactcagca caccaggtat
151 gtcacaactt gtgcttttgc acetaatacc cttttacttg ctactggttc
201 aatggacaaa acagtgaaca tctggcaatt tgacctggaa acactttgcc
251 aagcaaggcg cacagaacat cagctgaagc aatttacga agattggtca
301 gaggaggatg tctcaacatg gctttgtgca caagatttaa aagatcttgt
351 tggatatttc aagatgaata acattgatgg aaaagaactg ttgaatctta
401 caaaagaaag tctggctgat gatttgaaaa ttgaatctct aggactgeggt
451 agtaaagtgc tgaggaaaat tgaagagctc aggaccaagg ttaaatccct
501 ttcttcagga attcctgatg aatttatatg tccaataact agagaactta
551 tgaaagatcc ggtcatcgca tcagatggct attcatatga aaaggaagca
601 atggaaaatt ggatcagcaa aaagaaactg
```

FIG. 5

ttactttgtgtgaggaacatggtgaggtgattcacacgctggctgatcaggggatgacgt
cagctgctgcgcttctcggctgccctcctggccacctgctccttggacaagaccatccgtc
tgtactccctaagtgactttgttgaactgocgtactccccctgaagttccacacctatgct
gtccactgctgctgtttctcacctcaggacacgttttagcatcgtgctcgacagacgggac
cacgggtgctgtggagctcgcacagcggacaacctgaccgtgttggagcagccgggtggca
gcoctgtgcgctctgttgcctttccccagactctgcoctacctagcgtcaggggctgccgat
ggatccattgctttgtggaatgcacagacatacaaaactataatagggtggtgtagtgcaggga
tagctcattgggtggcctgtgcgttttctccgatggaggcctctttgtcactggctcctcgg
gccccgattgacagtggtggatgacagaatgaggtgtctcacacagcagagaaggcgcacgat
ctcgggatcacctgctgcagcttttctcacagcctctctctggcggagaaggcctccagtc
ltaccagttggcgtcatgtggtcaagactgtgaaactcaaacctctgggctgttactattacc
gtgtcttaagctttgaatataaaataaaaagcacactaagtgggctgccccctgtctctg
gcctgtgctttttcacatgatggaagatgcttgcactcggggtcagtggaataaatctgtcat
catacatggtatcggccctcagagtgctgtcacacgctgactcagcataccaggtatggtta
cgacttgtgcgtttgcaaccaactctcttacttgcactcgttcaatggacaagacagtg
aacatttggcagtttgacctggaacaccttgccaagcaggaagcatgaaocccccgtgaa
acatttcaactgaagaatggtcagaggaggatgtctcogtgggtctcgtgctcaaggcttgg
aagacctcgtcggatatttccagggcaaacacatcgatgggaaagaaactatgcatctca
aagaaagtctggctggatgaaatcgaatctcagggtcggcagcaagctcctgag
gagtttgaagagctcagggccaagatggattccctctctccggaatccctgacgagttca
tctgcccaataaccagagaactcatgaaggccccctcatcgcatcagatggctactcctac
gagagagaagcaatggaagctggatccacaagaagaagcgtacgagccccatgacaaattt
ggctctccctcactggtactgaccccaacaggaactgaagatggccatcaaccgatggc
tggagacgcaacgagaagtgaacgcttccacaggcatcggatccactttcagtgatgcctgc
aaatgattcaaaatgctaacgagccatcacgaaagcaaaataaaaggaaaagcaaatgttc
aattcagttacttttaaaaactgtaaatatgagcagggcagtggtggtgccacctttaat
cccagcactcaggaggcagagacaggtggatctccaggatcaggagttccaggacagcccc
tttataggccaagtctcaggacggccaaggctcacacagagaacctgctcaaaaaaccca
aaacccccaaaaaaaaaaaaaaaaaagtcattatctttaaaccacagatttatatatctatt
gtcattgctattctgtaaggtgaaaatatttttttttgcaataatgagaaactatgta
gaaataaaacttcactatgacttataaaaaaaaaaaaaaaaa

WO 02/066494

PCT/US02/05162

8/31

FIG. 6

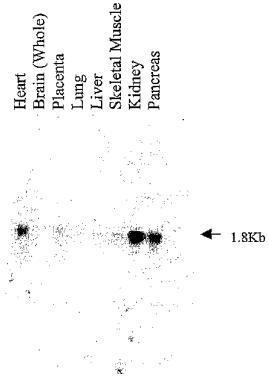
MVRLIHTLADHGDDVSCCAFSAALLATCSLDKTIRLYSLSDFVELPYSPKLFHT
YAVHCCCFSPSGHVLASCSTDGTTVLWSSHSGHTLVLEQPGGSPVRVCCF
SPDSAYLASGAADGSIALWNAQTYKLYRCGSVKDSSLVACAFSPDGGGLFVTG
SSGGDLTVWDDMRCLHSEKAHDLGITCCSFSSQPLSGGEGQLQSYQLASCG
QDCEIKLWAVTITRVLGFELKYKSTLSGHCAPVLACAFSHDGKMLASGSVDKS
VIHGIGPQSVLHLLTQHTRYVTTCAFAPNTLLLATGSMDKTVNIWQFDLETPC
QAGSMNDPLKHFTTEEWSEEDVSVWLRAQLEDLVGIFRANNIDGKELLHLTK
ESLAGDLKIESLGLRSKVLRSIEELRAKMDSLSSGIPDEFICPITRELMKDPVIA
SDGYSYEREAMESWIHKKKRTSPMTNLALPSLVLTNPRTLKMAINRWLETHEK

WO 02/066494

PCT/US02/05162

9/31

FIG. 7A



WO 02/066494

PCT/US02/05162

10/31
FIG. 7B

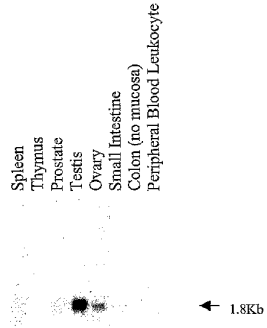
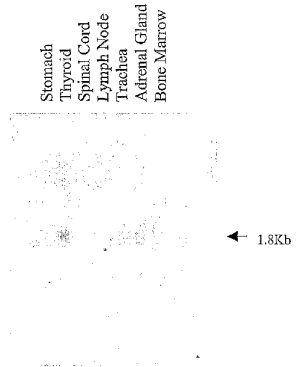


FIG. 7C



WO 02/066494

PCT/US02/05162

12/31

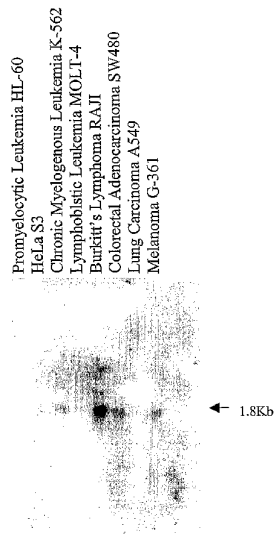


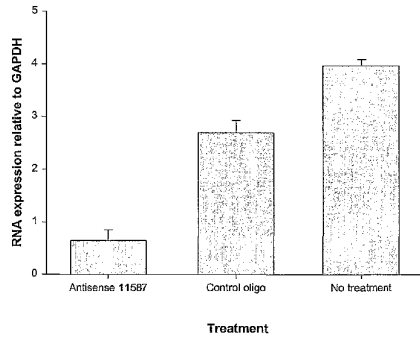
FIG. 7D

WO 02/066494

PCT/US02/05162

13/31

FIG. 8



WO 02/066494

PCT/US02/05162

14/31

FIG. 9

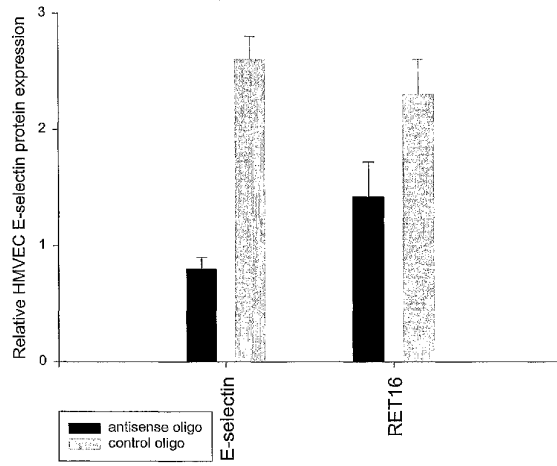


FIG. 10C

```

1  NVKLIHTLADHGDDVNCCAFSSLLATCSLDKTIIRLYSLRDFTELPHSPL 50
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
1  MVRLIHTLADHGDDVSCCAFSAALLATCSLDKTIIRLYSLDFVELFYSPL 50
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

51  KPFTYAVHCCCFSPSGHILASCSTDTTTLWNTENGQMLAVTEQPSGSPV 100
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
51  KPFTYAVHCCCFSPSGHVLASCSTDTTTLWNSHSGHTLTVLEQPGSPV 100
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

101  RVCQFSPDSTCLASGAADGTVWLNNAQSYKLYRCGSVKDGSIAACAFSPN 150
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
101  RVCQFSPDSAYLASGAADGSIALWNAQTYKLYRCGSVKDSSLVACAFSPD 150
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

151  GSPFFVNGSSCGDLTVWDDKMRCLHSEKAHDLGITCCDFSSQPVSDEQGL 200
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
151  GGLFVTVGSSCGDLTVWDDMRCLHSEKAHDLGITCCDFSSQPLSGGE.GL 199
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

201  QFFRLASCGQDCQVKIWIIVSFTHLGFELKYKSTLSGHCAPVLACAFSHD 250
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
200  QSYQLASCGQDCEIKLWAVTITRVLGFELKYKSTLSGHCAPVLACAFSHD 249
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

251  GOMLVSGSVDKSVIVYDINTENILHHTLQHTRYVITTCAPANTLLLATGS 300
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
250  GKMLASGSVDKSVIHHGIGPQSVLHTLQHTRYVITTCAPANTLLLATGS 299
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

301  MDKTVNIWQFDLETLCOARTEHQKQFTEDWSEEDVSTWLCQDLKDLV 350
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
300  MDKTVNIWQFDLETFCCAGSMNDPLKHFTEWSEEDVSVWLRAQGLEDLV 349
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

351  GIFKMNLDGKELLNLTKESSLADDLKIESLGLRSKVLKTEBELTKVKS 400
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
350  GIFRANNLDGKELLHLTKESLAGDLKIESLGLRSKVLRSIEELRAKMDSL 399
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

401  SSGIPDEFICPITRELMKDPVIASDGYSYKRAMENWISKKRISPMTNL 450
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
400  SSGIPDEFICPITRELMKDPVIASDGYSYERAMESWIHKKRISPMTNL 449
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

451  VLPNAVLTTPNRTLKMAINRWLETHQK 476
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:
450  ALPSLVLTTPNRTLKMAINRWLETHEK 475
   ||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:

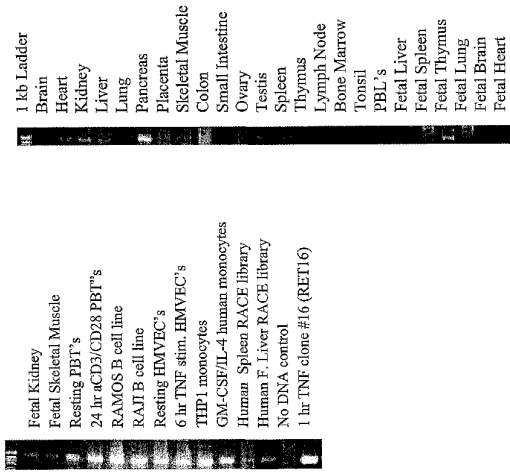
```


WO 02/066494

PCT/US02/05162

20/31

FIG. 11



Clone
Count

FIG. 12

| | |
|---|--|
| 3 | kidney, mw/renal cell CA, 65M, m/KIDNTUT15 |
| 3 | kidney tumor, clear cell type cancer, pool, SUB, CGAP |
| 2 | breast, NF breast disease, 35F |
| 2 | brain, frontal, Huntington's, mw/CVA, 57M |
| 2 | prostate tumor, adenoCA, 66M, m/PROSNOT15, PROSDINO1 |
| 2 | lung, mw/spindle cell carcinoid, 62F |
| 2 | brain, sensory-motor cortex, aw/CHF, 35M |
| 2 | liver/spleen, fetal, 20wM, NORM, CGAP/W/M/W/N |
| 2 | kidney, pool, SUB, 3' CGAP |
| 1 | pituitary tumor, adenoma, pool, 3', CGAP |
| 1 | prostate, PIN, mw/cancer, M, m/PROSTUP03, 3' CGAP |
| 1 | colon, cecum/descending, polyposis, polyp, M/F, pool, NORM |
| 1 | esophagus tumor, adenoCA, 61M, NORM |
| 1 | ovary tumor, papillary serous CA, 64F, W/M/W/N |
| 1 | bronchial, epithelial cells, 23M, 1/20% smoke 20 hr |
| 1 | T-B lymphoblast line, leukemia, untreated |
| 1 | paraganglion tumor, paraganglioma, aw/renal cell CA, 46M |
| 1 | sm intestine, ileum, mw/CUC, 42M |
| 1 | brain, hippocampus, AD |
| 1 | brain, hippocampus, aw/aortic aneurysm, 45F, 5RP |
| 1 | ovary, aw/leiomyomata, 43F |
| 1 | bladder tumor, TC CA, 72M |
| 1 | breast, mw/ductal adenoCA, aw/node mets, 46F, m/BRSTTUT15 |
| 1 | gallbladder, cholecystitis, cholelithiasis, 18F |
| 1 | prostate, mw/adenoCA, 68M, m/PROSTUT18 |
| 1 | T-lymphocytes, CD4+, pool, 1/CD3 antibodies |
| 1 | lung tumor, mets granulosa cell tumor, 80F |
| 1 | breast, PF changes, mw/adenoCA, 45F, m/BRSTTUT08 |
| 1 | CML precursor line, K-562, 53F, 1/5AZA 72 hr |
| 1 | lung tumor, adenoCA, 47M |
| 1 | colon, appendix, aw/leiomyomata, 37F |
| 1 | uterus, myometrium, mw/leiomyoma, 41F, NORM, m/UTRSTUT05 |
| 1 | esophagus tumor, adenoCA, 61M |
| 1 | colon tumor, adenoCA, 75M, m/COLNNOT01 |
| 1 | brain, temporal, mw/neuroepithelial tumor, epilepsy, 45M |
| 1 | brain, medulla, aw/CHF, 35M |
| 1 | kidney, 49M |
| 1 | uterus, endometrium, F, pool |
| 1 | paraganglion tumor, paraganglioma, aw/renal cell CA, 46M |
| 1 | prostate, AH, mw/adenoCA, node mets, 55M, Ig/N, m/PROSTUT16 |
| 1 | brain, neurogenic tumor line, SK-N-MC, neuroepithelioma, 14F |
| 1 | adrenal tumor, pheochromocytoma, 57F |
| 1 | brain, striatum/globus pallidus/putamen, aw/CHF, 81F, RP |
| 1 | bone marrow, tibia, aw/mets alveolar rhabdomyoSAR, 16M |
| 1 | thyroid, lymphocytic thyroiditis, mw/papillary CA, 30F |
| 1 | breast, mw/ductal CA, CA in situ, aw/node mets, 62F |
| 1 | liver tumor, mets neuroendocrine CA, 62F, m/LIVRTMR01 |
| 1 | umb cord blood, mononuclear cells, 1/IL-5 |
| 1 | uterus tumor, serous papillary CA, F, pooled, 3' CGAP |
| 1 | lung, fetal, 19w, NORM, CGAP/W/M/W/N |
| 1 | placenta, neonatal, F, NORM, WM |
| 1 | uterus, F, NORM, CGAP/W/M/W/N |
| 1 | pancreas tumor, adenoCA, 3' CGAP |
| 1 | brain, infant, 10wF, NORM, WM |
| 1 | testis, M, NORM, CGAP/W/N |
| 1 | liver/spleen, fetal, 20wM, NORM, WM |
| 1 | mixed tissues, fetal lung, testis, B-cell, SUB, 3' CGAP/W/N |

WO 02/066494

PCT/US02/05162

22/31

FIG. 13

tgaagagttcatctgcccataaaccagggaaacttatgaaggaccccgatcgcatca
gatggctactcctacgagagagaagcaatggagagttggatcccaagaagaagcgca
cgagcccatgacaaacttggctcttcttactggtactgacccaaacaggactct
gaaaatggccatcaatcgatggctagagacgcacagaagtgaacctgccacaggca
tcgggtacactgtcagtgatgacctcagatgattcaaatgctaagcagccattaca
gaagcaataaaagggaggacagacgttaaatccagttacttttaaaactgtaac
tgaagcaggttaagtggtagcgcacacctttaatcccagcactcaggaggcagaggca
ggtaggtctccatgaattccaggccagcctggtctatagggcgagttccaggacggca
aggctacacagagaaccctgtctcaaaacctaaaagcaaaaaaaaaaaaaaaaa

FIG. 14

DEFTCPITRELMKDFVIASDGYSYEREAMESWIHKKKRTSPMTNLALPSLVLPNRTL
KMAINRWLETHQK

WO 02/066494

PCT/US02/05162

23/31

FIG. 15

```

MSRT16 M V K L I H T L A D H S D D V N G C A F S F S L L A T G S L D K T I R L Y S L R D E T E L P H S P L
MSRT16 M V R L L H L L A D H S D D V S C A F S A A L L A T G S L D K T I R L Y S L S D E V S L P Y S L L
MSRT16 - - - - -
MSRT16 K F H T Y A V H C C C F S S G H I L A S C S T D G T Y L W N T E R G Q M L A V M E Q F S G S P V
MSRT16 K F H T Y A V H C C C F S S G H I L A S C S T D G T Y L W S S H S G H T L T V L E D P G S S D V
MSRT16 - - - - -
MSRT16 N V G L P S D S T C L A S C A A C G T V V M N A D S R R A Y R C S S Y R D G S L A C A F S F N
MSRT16 N V L C F S T E S I A Y L A S S A A D C S I A L W N A Q T Y K L R G S Y K D S G L V A D A E S S D
MSRT16 - - - - -
MSRT16 S S F F W T G S S C G D L T V W D Q K R C I A S E R K A P D L C I T D D D F S S Q R V S D Q E Q D P
MSRT16 S I L F V R G S S G S D L Y W D D R M B E C H S E R A N D S G I T C S E S S Q R L S I Q E E Q E
MSRT16 - - - - -
MSRT16 Q P F R L A S C G C D Q V R I W I V S F F H I E G F E L K Y K S T L S G H C A P V L A S A F S D D
MSRT16 Q S Y C L A S C G C D Q E I K L W I A V T I L R V E G F E L K Y K S T L S G H C A P V L A S A F S D D
MSRT16 - - - - -
MSRT16 S I M L V S G S V K S M I V Y D T N T E N I S Y L T G H T S V W T G A P A R N P L L A T G S
MSRT16 S P M R A S G S W P K S Y H H G I G P C S V R M T Y R H H E M Y V T T C A F A E N R L L A T G S
MSRT16 - - - - -
MSRT16 M D K T V N L W Q R D L E T L C Q A R R T E H Q L W Q F T E D W S E E D V S Y W L C A Q D L K D L V
MSRT16 M D K T V N L W Q R D L E T P C Q A G S M N D P E X H F E E W S E E D V S Y W L R A Q E D L V
MSRT16 - - - - -
MSRT16 S I R K M N N S R S L E N L T R E S A D D L E T E S G L R S K V L R K I E E R T K V K S L
MSRT16 S I P R A N N L D K K E L L H L T K E S L A G D E T E S G L R S K L R S I E E R A M D S L
MSRT16 - - - - -
MSRT16 S S G H P
MSRT16 S S G I E
MSRT16 - - - - -
MSRT16 V
MSRT16 A
MSRT16 A

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

24/31

FIG. 16

```

82716.1 MVKLIHTLADHGDDVNC C A F S F S L L A T G S L D K T I R L Y S L R D F T E L P H S P L
82716.2 MVKLIHTLADHGDDVNC C A F S F S L L A T G S L D K T I R L Y S L R D F T E L P H S P L
82716.3 MVKLIHTLADHGDDVNC C A F S F S L L A T G S L D K T I R L Y S L R D F T E L P H S P L

82716.1 K F H T Y A V H C C C F S P S G H I L A S C S T D G T T V L W N T E N G Q M L A V M E Q P S G S P V
82716.2 K F H T Y A V H C C C F S P S G H I L A S C S T D G T T V L W N T E N G Q M L A V M E Q P S G S P V
82716.3 K F H T Y A V H C C C F S P S G H I L A S C S T D G T T V L W N T E N G Q M L A V M E Q P S G S P V

82716.1 R V C Q F S P D S T C L A S G A A D G T V V L W N A Q S Y K L Y R C G S V K D G S L A A C A F S P N
82716.2 R V C Q F S P D S T C L A S G A A D G T V V L W N A Q S Y K L Y R C G S V K D G S L A A C A F S P N
82716.3 R V C Q F S P D S T C L A S G A A D G T V V L W N A Q S Y K L Y R C G S V K D G S L A A C A F S P N

82716.1 G S F F V T G S S C G D L T V W D D K M R C L H S E K A H D L G I T C C D F S S Q P V S D G E Q G L
82716.2 G S F F V T G S S C G D L T V W D D K M R C L H S E K A H D L G I T C C D F S S Q P V S D G E Q G L
82716.3 G S F F V T G S S C G D L T V W D D K M R C L H S E K A H D L G I T C C D F S S Q P V S D G E Q G L

82716.1 Q F F R L A S C G D C C V K I W I V S F T H I L
82716.2 Q F F R L A S C G D C C V K I W I V S F T H I L
82716.3 Q F F R L A S C G D C C V K I W I V S F T H I L

82716.1
82716.2
82716.3

82716.1 A R R T E H Q L K Q F T E D W S E E D V S T W L C A Q D L K D L V
82716.2 A R R T E H Q L K Q F T E D W S E E V V S T W L C A Q D L K D L V
82716.3 A R R T E H Q L K Q F T E D W S E E D V S T W L C A Q D L K D L V

82716.1 G I F K M N N I D G K E L L N L T K E S L A D D L K I
82716.2 G I F K M N N I D G K E L L N L T K E S L A D D L K I
82716.3 G I F K M N N I D G K E L L N L T K E S L A D D L K I

82716.1 . . . E S L G L R S K V L R K I E E L R T K V K S L S S G I P D E F I C P I T R E L M K D P V I A S
82716.2 . . . E S L G L R S K V L R K I E E L R T K V K S L S S G I P D E F I C P I T R E L M K D P V I A S
82716.3 . . . E S L G L R S K V L R K I E E L R T K V K S L S S G I P D E F I C P I T R E L M K D P V I A S

82716.1 D G Y S Y E K E A M E N W I S K K K R T S P M T N L V L P S A V L T P N R T L K M A I N R W L E T H
82716.2 D G Y S Y E K E A M E N W I S K K K R T S P M T N L V L P S A V L T P N R T L K M A I N R W L E T H
82716.3 D G Y S Y E K E A M E N W I S K K K R T S P M T N L V L P S A V L T P N R T L K M A I N R W L E T H

82716.1 Q K
82716.2 Q K
82716.3 Q K

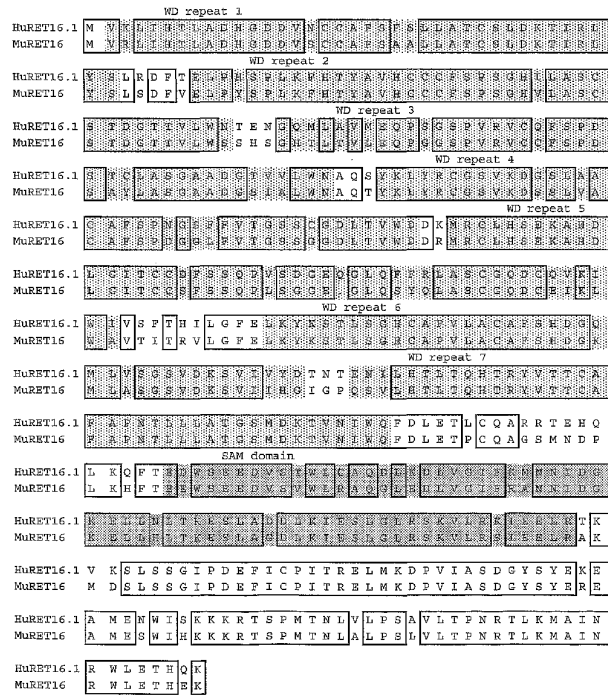
```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

25/31

FIG. 17

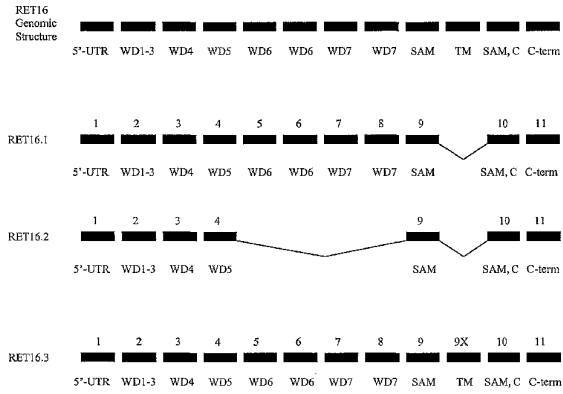


WO 02/066494

PCT/US02/05162

26/31

FIG. 18



WO 02/066494

PCT/US02/05162

27/31

FIG. 19A

gaattcggcctttcaoctgcccggcaogtgacccgcaccgcccgtgggcacctgaaggcg
gatcccgcgccccccgctcctgcaggctgtttttcttcaaataaagaacatggtgaaac
tgattcacacattagctgatcatggtgacgatgtcaactgctgtgccttctcctttccc
t.cttggctacttgctccttggacaaaacaattcgcctgtactcgttacgtgactttactg
aactgccacattctccattgaagtctcatcctatgctgtcactgctgctgtttctccc
cttcaggacatattttggcatogtgtcaacagatggtaccactgtcctatggaactg
aaaaaggacagatgctggcagtgatggaaacagcctagtggcagccctgtgaggggttgcc
agttttcccagactccacgtgtttggcatcaggggcagctgatggaactgtgggtttgt
ggaaatcacacatcacaataatataatagatggtgtagttaaagatggctccttggcgg
catgtgcattttctcctaatggaagcttcttctgactggctcctcatgtggtgatata
cagtggtggatgataaaatgaggtgtctgcatagtgaaaaagccatgatctlggaatta
cctgctgcgattttctcacagccagttctgatggagaacaaggtcttcagtttttc
gactggcatcatgtggtcaggatgccaagtcaaaatllggattgtttctttaccata
tcttagcaaggcgcacagaacatcagctgaagcaattaccgaagatggtcagaggagg
tcgtctcaacatggccttctgcaacaagattttaaagatcttgggtatcttcaagatga
ataacattgatggaaaagaactgtgaatcttcaaaaagaagctcggctgatgatltga
aaattgaatctctaggactgcgtagttaaagtgctgaggaaaatgaaagactcaggacca
aggttaaatccctttctcaggaattcctgatgaatttatalgtccaataactagagaac
ttatgaaagatccggtcatcgcatcagatggctattcatatgaaaaggaagcaatggaaa
atgggatcagcaaaaagaacgtacaagtcccatgacaaatctgttcttctcagcgg
tacttacaccaaataggactctgaaaatggccatcaatagatggctggagacacacaaa
agtaaagaattc

WO 02/066494

PCT/US02/05162

28/31

FIG. 19B

MVKLIHTLADHGDDVNCCAFSFSLLATCSLDKTIIRLYSLRDFTELPHSPLKFHTYAVH
CCCFSPSGHILASCSTDGTTVLWNTENGQMLAVMEQPSGSPVRVCQFSPDSTCLASGA
ADGTVVLWNAQSYKLYRCGSVKDGLAACAFAFSPNGSFFVTGSSCGDLTVWDDKMRCLH
SEKAHDLGITCCDFSSQPVSDGEQGLQFPRLASCCQDCQVKIWIIVSFTHILARRTEHQ
LKQPTEDWSEEVVSTWLCADLKDVLGIFKMNNDGKELNLTKESSLADDLKIESLGL
RSKVLRKIEELRTKVKLSLSSGIPDEFICPITRELMKOPVIASDGYSYEKEMBNWISK
KKRTSPMTNLVLPASAVLTPNRTLKMAINRWLETHQK

FIG. 20B

MVKLIHTLADHGDDVNCCAFSPSLLATCSLDKTIIRLYSLRDFTELPHSPLKPHYAV
HCCCFSPSGHILASCSTDGTTVLNNTENGQMLAVMEQPSGSPVRCQFSPDSTCLAS
GAADGTVVLWNAQSYKLYRCGSVKGSLAACAFSPNGSFFVTGSSCGDLTVWDDKMR
CLHSEKAHDLGITCCDFSSQPVSDGRQGLQFFRLASCGQDCQVKIWI VSFTHILGFE
LKYSKSTLSGHCAFVLACAFSHDGMVSGSVDKSVIVYDINTENILHTLTQHTRYVT
TCAPAPNLLLLATGSMKTVNIWQFDLETLCQARRTEHQLKQFTEDWSEEDVSTWLC
AQDLKDLVGIKMNNDGKELLNLTKESLADDLKIGWSPLAWSCLTAASTSWAQVIL
LPRPOSGLRSKVLKIEELRTKVKSLSSGIPDEFICPIITRELMKDPVIASDGYSYB
KEAMENWISKKKRTSPMTNLVLPASAVLTPNRTLKMAINRWLETHQK

WO 02/066494

PCT/US02/05162

SEQUENCE LISTING

<110> BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

<120> TBA

<130> 3053-4114PC

<140>

<141>

<150> 60/294,181

<151> 2001-05-29

<150> 60/269,366

<151> 2001-02-16

<160> 25

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1818

<212> DNA

<213> HUMAN

<400> 1

```

gectgttccc tetgctctgg gtctccgccc ggcggggccc cggcagctc acctgcccgg 60
cactgaccc gccccgccc tgggcaactt gaaggcggat cccgcggccc cccgctcctg 120
caggctgctt ttcttcaaat aaagaacatg gtgaaactga ttcacacatt agctgatcat 180
ggtgacgatg tcaactgctg tgccttctcc ttttccctct tggctacttg ctccctggac 240
aaaacaattc gccctgtactc gttacgtgac ttactgaac tgccacatcc tccattgaag 300
tttcatacct atgctgtcca ctgctgctgt ttctccctcc caggacatat ttggcatcgg 360
tgttcaacag atggtaccac tgtcctatgg aatactgaaa atggacagat gctggcagtg 420
atggaaacag ctagtggcag cctctgtgag gtttggcagt ttcccccaga ctccacgtgt 480
ttggcatcag gggcagctga tggaaactgtg gttttgtgga atgcacagtc atacaaatta 540
tatagatgtg gtatgtttaa agatggctcc ttggcggcat gtgcattttc tccaatgga 600
agcttctttg tcaactggctc ctcatgtggt gatttaacag tgtgggatga taaatgagg 660
tgtctgcata gtgaaaaagc acatgatctt ggaattacct gctgcgattt ttcttcaacg 720
ccagtttctg atggagaaca aggtcttcag tttttctgac tggcatcatg tggtcaggat 780
tgccaagtca aaatttggat tgtttctttt acccatatct taggttttga attaaaatat 840
aaaagtacac tgagtgggca ctgtgctcct gttctggctt gtgcttttcc ccatgatggg 900
cagatgctag tctcagggtc agtggataag tctgtcatag tatatgatac taatctgag 960
aatatacttc acacattgac tcagcacacc aggtatgtca caacttgtgc ttttgcacct 1020
aatacccttt tacttgctac tggttcaatg gacaaaacag tgaacatctg gcaatttgac 1080
ctggaaacac ttgccaagc aaggcgacac gaacatcagc tgaagcaatt taccgaagat 1140
tggtcagagg aggatgtctc aacatggctt tgtgcacaag attttaaaga tcttgttgg 1200
attttcaaga tgaataacat tgatggaaaa gaactgttga atcttacaac agaaagtctg 1260

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

```

gctgatgatt tgaaaattga atctctagga ctgcgtagta aagtgcgtag gaaaattgaa 1320
gagctcagga ccaagggttaa atccctttct tcaggaattc ctgatgaatt tatatgtcca 1380
ataactagag aacttatgaa agatccggtc atcgcatcag atggctattc atatgaaaag 1440
gaagcaatgg aaaattggat cagcaaaaag aaactgacaa gtcccatgac aaatcttggt 1500
cttcctctcag cggtacttac accaaatagg actctgaaaa tggccatcaa tagatggctg 1560
gagacacacc aaaagtaaaa ttgttgatat tgtattatct atattttcag tgaatctcatt 1620
tgaatgattt ataggtaaat actaatcaga cattattaaa agcaaaaacag gaaaaaggta 1680
aacttcttaa atttagttac ctataaaaat tgtcaatttt cattctttaa aaaacacatg 1740
gaactactat aaaagccttt ttgtactagt gaaaagaatc ttcagctata tagaaataaa 1800
gttatacttt aaaaaaaaa 1818

```

<210> 2
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> HUMAN

```

<400> 2
Met Val Lys Leu Ile His Thr Leu Ala Asp His Gly Asp Asp Val Asn
  1          5          10          15

Cys Cys Ala Phe Ser Phe Ser Leu Leu Ala Thr Cys Ser Leu Asp Lys
  20          25          30

Thr Ile Arg Leu Tyr Ser Leu Arg Asp Phe Thr Glu Leu Pro His Ser
  35          40          45

Pro Leu Lys Phe His Thr Tyr Ala Val His Cys Cys Cys Phe Ser Pro
  50          55          60

Ser Gly His Ile Leu Ala Ser Cys Ser Thr Asp Gly Thr Thr Val Leu
  65          70          75          80

Trp Asn Thr Glu Asn Gly Gln Met Leu Ala Val Met Glu Gln Pro Ser
  85          90          95

Gly Ser Pro Val Arg Val Cys Gln Phe Ser Pro Asp Ser Thr Cys Leu
  100         105         110

Ala Ser Gly Ala Ala Asp Gly Thr Val Val Leu Trp Asn Ala Gln Ser
  115         120         125

Tyr Lys Leu Tyr Arg Cys Gly Ser Val Lys Asp Gly Ser Leu Ala Ala
  130         135         140

Cys Ala Phe Ser Pro Asn Gly Ser Phe Phe Val Thr Gly Ser Ser Cys
  145         150         155         160

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Gly Asp Leu Thr Val Trp Asp Asp Lys Met Arg Cys Leu His Ser Glu
 165 170 175
 Lys Ala His Asp Leu Gly Ile Thr Cys Cys Asp Phe Ser Ser Gln Pro
 180 185 190
 Val Ser Asp Gly Glu Gln Gly Leu Gln Phe Phe Arg Leu Ala Ser Cys
 195 200 205
 Gly Gln Asp Cys Gln Val Lys Ile Trp Ile Val Ser Phe Thr His Ile
 210 215 220
 Leu Gly Phe Glu Leu Lys Tyr Lys Ser Thr Leu Ser Gly His Cys Ala
 225 230 235 240
 Pro Val Leu Ala Cys Ala Phe Ser His Asp Gly Gln Met Leu Val Ser
 245 250 255
 Gly Ser Val Asp Lys Ser Val Ile Val Tyr Asp Thr Asn Thr Glu Asn
 260 265 270
 Ile Leu His Thr Leu Thr Gln His Thr Arg Tyr Val Thr Thr Cys Ala
 275 280 285
 Phe Ala Pro Asn Thr Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser Met Asp Lys Thr
 290 295 300
 Val Asn Ile Trp Gln Phe Asp Leu Glu Thr Leu Cys Gln Ala Arg Arg
 305 310 315 320
 Thr Glu His Gln Leu Lys Gln Phe Thr Glu Asp Trp Ser Glu Glu Asp
 325 330 335
 Val Ser Thr Trp Leu Cys Ala Gln Asp Leu Lys Asp Leu Val Gly Ile
 340 345 350
 Phe Lys Met Asn Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Lys
 355 360 365
 Glu Ser Leu Ala Asp Asp Leu Lys Ile Glu Ser Leu Gly Leu Arg Ser
 370 375 380
 Lys Val Leu Arg Lys Ile Glu Glu Leu Arg Thr Lys Val Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Ser Ser Gly Ile Pro Asp Glu Phe Ile Cys Pro Ile Thr Arg Glu Leu
 405 410 415

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Met Lys Asp Pro Val Ile Ala Ser Asp Gly Tyr Ser Tyr Glu Lys Glu
 420 425 430

Ala Met Glu Asn Trp Ile Ser Lys Lys Lys Arg Thr Ser Pro Met Thr
 435 440 445

Asn Leu Val Leu Pro Ser Ala Val Leu Thr Pro Asn Arg Thr Leu Lys
 450 455 460

Met Ala Ile Asn Arg Trp Leu Glu Thr His Gln Lys
 465 470 475

<210> 3
 <211> 1553
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<400> 3
 gaattcgggt ttcacctgag cggcacgtga cccgcaccgc cegtggggac cttgaaggcg 60
 gatcccgcgc gcccccgcct ctcgaggctg tttttcttca aataaagaac atgggtgaaac 120
 tgattcacac attagctgat catggtgacg atgtcaactg ctgtgccttc tccttttccc 180
 tcttggctac ttgctccttg gacaaaacaa ttcgcctgta ctcgttacgt gactttactg 240
 aactgccaca ttctccattg aagtttcata cctatgctgt ccactgctgc tgtttctccc 300
 cttcaggaca tattttggca tctgttcaaa cagatggtae cactgtccta tggaaactg 360
 aaaatggaca gatgctggca gtgatggaac agcctagtgg cagccctgtg agggtttggc 420
 agltttcccc agactccacg tgtttggcat caggggcagc tgatggaaac gtggttttgt 480
 ggaatgcaca gtcatacaaa ttatatagat gtggtagtgt taaagatggc tccttggcgg 540
 catgtgcatt ttctcctaag ggaagcttct ttgtcaactg ctctcatgt ggtgatgtaa 600
 cagtgctgga tgataaaatg aggtgtctgc atagtgaaaa agcacatgat cttggaatta 660
 cctgctgcga tttttcttca cagccagttt ctgatggaga acaaggctct cagltttttc 720
 gactggcacc atgtggctag gattgccaag tcaaaatttg gattgittct tttaccata 780
 tcttaggttt tgaattaaaa tataaaagta cactgagtag gcactgtgct cctgttctgg 840
 cttgtgcttt ttcccgtgat gggcagatgc tagtctcagg gtcagtgatg aagtctgta 900
 tagtatatga tactaatact gagaatatac ttcacacatc gactcagcac accaggtagt 960
 tcacaacttg tgcttttgc cetaataccc ttttacttgc tactggttca atggacaaaa 1020
 cagtgaacat ctggcaattt gacctggaaa cactttgcca agcaaggcgc acagaacatc 1080
 agctgaagca atttaccgaa gattggtcag agggagatgt ctcaacatgg ctttgtgcat 1140
 aagatttaaa agatcttgtt ggtattttca agatgaataa cattgatgga aaagaactgt 1200
 tgaatcttac aaaagaaagt ctggctgatg atttgaaat tgaatcteta ggactgogta 1260
 gtaaagtgtc gaggaaaatt gaagagctca ggaccaaggt taaatccctt tcttcaggaa 1320
 ttctgatgga atttatatgt ccaataacta gagaacttat gaaagatccg gtcactcgcat 1380
 cagatggcta ttcatatgaa aaggaagcaa tggaaaattg gatcagcaaa aagaaacgta 1440
 caagtcccat gacaaatctt gttcttctct cagcgytaet tacaccaaat aggactctga 1500
 aaatggccat caatagatgg ctggagacac accaaaagta aaaagccgaa ttc 1553

<210> 4

WO 02/066494

PCT/US02/05162

<211> 512
<212> PRT
<213> HUMAN

<400> 4

```

Ile Arg Leu Ser Pro Ala Arg His Val Thr Arg Thr Ala Arg Gly His
 1           5           10           15

Leu Glu Gly Gly Ser Arg Ala Pro Pro Leu Leu Gln Ala Val Phe Leu
           20           25           30

Gln Ile Lys Asn Met Val Lys Leu Ile His Thr Leu Ala Asp His Gly
           35           40           45

Asp Asp Val Asn Cys Cys Ala Phe Ser Phe Ser Leu Leu Ala Thr Cys
           50           55           60

Ser Leu Asp Lys Thr Ile Arg Leu Tyr Ser Leu Arg Asp Phe Thr Glu
           65           70           75           80

Leu Pro His Ser Pro Leu Lys Phe His Thr Tyr Ala Val His Cys Cys
           85           90           95

Cys Phe Ser Pro Ser Gly His Ile Leu Ala Ser Cys Ser Thr Asp Gly
           100          105          110

Thr Thr Val Leu Trp Asn Thr Glu Asn Gly Gln Met Leu Ala Val Met
           115          120          125

Glu Gln Pro Ser Gly Ser Pro Val Arg Val Cys Gln Phe Ser Pro Asp
           130          135          140

Ser Thr Cys Leu Ala Ser Gly Ala Ala Asp Gly Thr Val Val Leu Trp
           145          150          155          160

Asn Ala Gln Ser Tyr Lys Leu Tyr Arg Cys Gly Ser Val Lys Asp Gly
           165          170          175

Ser Leu Ala Ala Cys Ala Phe Ser Pro Asn Gly Ser Phe Phe Val Thr
           180          185          190

Gly Ser Ser Cys Gly Asp Leu Thr Val Trp Asp Asp Lys Met Arg Cys
           195          200          205

Leu His Ser Glu Lys Ala His Asp Leu Gly Ile Thr Cys Cys Asp Phe
           210          215          220

Ser Ser Gln Pro Val Ser Asp Gly Glu Gln Gly Leu Gln Phe Phe Arg

```

WO 02/066494 PCT/US02/05162

225 230 235 240

Leu Ala Ser Cys Gly Gln Asp Cys Gln Val Lys Ile Trp Ile Val Ser
245 250 255

Phe Thr His Ile Leu Gly Phe Glu Leu Lys Tyr Lys Ser Thr Leu Ser
260 265 270

Gly His Cys Ala Pro Val Leu Ala Cys Ala Phe Ser Arg Asp Gly Gln
275 280 285

Met Leu Val Ser Gly Ser Val Asp Lys Ser Val Ile Val Tyr Asp Thr
290 295 300

Asn Thr Glu Asn Ile Leu His Thr Leu Thr Gln His Thr Arg Tyr Val
305 310 315 320

Thr Thr Cys Ala Phe Ala Pro Asn Thr Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser
325 330 335

Met Asp Lys Thr Val Asn Ile Trp Gln Phe Asp Leu Glu Thr Leu Cys
340 345 350

Gln Ala Arg Arg Thr Glu His Gln Leu Lys Gln Phe Thr Glu Asp Trp
355 360 365

Ser Glu Glu Asp Val Ser Thr Trp Leu Cys Ala Gln Asp Leu Lys Asp
370 375 380

Leu Val Gly Ile Phe Lys Met Asn Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Leu
385 390 395 400

Asn Leu Thr Lys Glu Ser Leu Ala Asp Asp Leu Lys Ile Glu Ser Leu
405 410 415

Gly Leu Arg Ser Lys Val Leu Arg Lys Ile Glu Glu Leu Arg Thr Lys
420 425 430

Val Lys Ser Leu Ser Ser Gly Ile Pro Asp Glu Phe Ile Cys Pro Ile
435 440 445

Thr Arg Glu Leu Met Lys Asp Pro Val Ile Ala Ser Asp Gly Tyr Ser
450 455 460

Tyr Glu Lys Glu Ala Met Glu Asn Trp Ile Ser Lys Lys Lys Arg Thr
465 470 475 480

Ser Pro Met Thr Asn Leu Val Leu Pro Ser Ala Val Leu Thr Pro Asn

WO 02/066494

PCT/US02/05162

485

490

495

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Thr | Leu | Lys | Met | Ala | Ile | Asn | Arg | Trp | Leu | Glu | Thr | His | Gln | Lys |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | | 510 | |

<210> 5
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <223> 630 bp partial nucleic acid sequence of human
 RET16 cDNA

```

<400> 5
acactgagtg ggcactgtgc tccigtcttg gcttgtgctt ttcccatga tggcagatg 60
ctagctctcag ggtcagtgga taagtctgtc atagtatatg atactaatac tgagaatata 120
cttcacacat tgactcagca caccaggatg gtcacaactt gtgcttttgc acctaatacc 180
cttttacttg ctactggttc aatggacaaa acagtgaaca tctggcaatt tgacctggaa 240
acactttgoc aagcaaggcg cacagaacat cagctgaagc aatttacga agattggtea 300
gaggaggatg tctcaacatg gctttgtgca caagatttaa aagatcttct tggatatttc 360
aagatgaata acattgatgg aaagaaactg ttgaatctta caaaagaaag tctggctgat 420
gatttgaaaa ttgaatctct aggaactgct agtaaaagtgc tgaggaaaaat tgaagagctc 480
aggaaacaag ttaaatccct ttcttcagga attcctgalg aatttatatg tccaataact 540
agagaactta tgaagatcc ggtcatcgca tcagalggct attcatatga aaaggaagca 600
atggaaaatt ggatcagcaa aaagaaactg                                     630
  
```

<210> 6
 <211> 1901
 <212> DNA
 <213> MOUSE

```

<400> 6
ttactttgtg tgaggaacat ggtgaggttg attcacacgc tggctgatca cggggatgac 60
gtcagctgct ggcctctctc ggtgcctcct ctggccacct gctccttggc caagaccatc 120
cgtctgtact ccctaagtga ctttgttgaa ctgcccactc ccccgctgaa gttccacacc 180
tatgctgtcc actgctgctg ttctcaccct tcaggacacg ttttagcctc gtgctcgaca 240
gacgggacca cgggtgctgt gagctcgcac agcggacaca cactgacctg gttggagcag 300
ccgggtggca gccctgtgct cgtctgtgtc ttttcccag actctgccta cctagcgtca 360
ggggctgccc atggatccat tgctttgtgg aatgcacaga catacaactc abataaggtgt 420
ggtagtgtca aggatagctc attggtggcc tgtgcgtttt ctcccgatgg aggcctcttt 480
gtcactggct cctcgggccc ggacttgaca gtgtgggatg acagaatgag gtgtctaac 540
agcgagaagg cgcacgatct cgggacacc tgcctgaact ttctctcaca gcctctctct 600
  
```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

```

gggggagaag gcctccagtc ttaccagttg gcgtoatgtg gtcgaagactg tgsaatcaaa 660
ctctgggctg ttactattac ccgtgtctta ggctttgaaat taaaatataa aagcacacta 720
agtgggcaact gcgcccctgt tctggcctgt gctttttcac atgatggaaa gatgcttga 780
tcggggctcag tggataaaic tgtcatoata catggtatcg gccctoaagag tgtgctacac 840
acgctgactc agcataccag gatatgttac acttgtgcgt ttgcacccaa cactctctta 900
cttgctactg gttcaatgga caagacagtg aacatttggc agtttgacct ggaacacct 960
tgccaagcag gaagcatgaa cgaccogctg aaacatttca ctgaagaatg gtcagaggag 1020
gatgtctccg tgtggcttcg tgcctaaaggc ttggaagacc tcgtcggtat ttcagggca 1080
aacaacatcg atgggaaaga actattgcat ctcaaaaagg aaagtctggc tggtgatttg 1140
aaaatcgaat ctctaggctc gcgcagcaaa gtccctgagga gtattgaaga gctcagggcc 1200
aagatggatt cctctcttcc cggaatccct gacgagttca tctgcccaat aaccagagaa 1260
ctcatgaagg accocgtcat cgcatacagat ggctactcct acgagagaga agcaatggaa 1320
agctggatcc acaagaagaa gcgtacgagc cccatgacaa atttggctct ccctcactg 1380
gtactgacc caaacaggac actgaagatg gccatcaacc gatggctgga gacgcacgag 1440
aagtgaaccg gttcacagcg atcggatcca ctttcagtga tgcctcgcaa atgattcaaa 1500
atgctaagca gccatcacga aagcaaaaata aaaggaaaag acaaatgttc aattcagtta 1560
cttttaaaaa ctgtaaatga tgagcagggc agtgggtggtg cccaccttta atcccagcac 1620
tcaggaggca gagacaggtg gatctccagg atcaggagtt ccaggacagc ccagtttata 1680
gggcaagtct caggacggcc aaggctacac agagaaaacc tgtctcaaaa aacccaaac 1740
ccaaaaaaa aaaaaaaaa agtcaattat ctttaaaaaa cagatttata tatctattgt 1800
cattgctatt tctgtaaagg tgaatatatt tttttttttg caataatgag aaactatgta 1860
gaaataaac ttactatga ctttaaaaaa aaaaaaaaa a 1901

```

```

<210> 7
<211> 475
<212> PRT
<213> MOUSE

```

```

<400> 7
Met Val Arg Leu Ile His Thr Leu Ala Asp His Gly Asp Asp Val Ser
1 5 10 15
Cys Cys Ala Phe Ser Ala Ala Leu Leu Ala Thr Cys Ser Leu Asp Lys
20 25 30
Thr Ile Arg Leu Tyr Ser Leu Ser Asp Phe Val Glu Leu Pro Tyr Ser
35 40 45
Pro Leu Lys Phe His Thr Tyr Ala Val His Cys Cys Cys Phe Ser Pro
50 55 60
Ser Gly His Val Leu Ala Ser Cys Ser Thr Asp Gly Thr Thr Val Leu
65 70 75 80
Trp Ser Ser His Ser Gly His Thr Leu Thr Val Leu Glu Gln Pro Gly
85 90 95

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Gly Ser Pro Val Arg Val Cys Cys Phe Ser Pro Asp Ser Ala Tyr Leu
 100 105 110

Ala Ser Gly Ala Ala Asp Gly Ser Ile Ala Leu Trp Asn Ala Gln Thr
 115 120 125

Tyr Lys Leu Tyr Arg Cys Gly Ser Val Lys Asp Ser Ser Leu Val Ala
 130 135 140

Cys Ala Phe Ser Pro Asp Gly Gly Leu Phe Val Thr Gly Ser Ser Gly
 145 150 155 160

Gly Asp Leu Thr Val Trp Asp Asp Arg Met Arg Cys Leu His Ser Glu
 165 170 175

Lys Ala His Asp Leu Gly Ile Thr Cys Cys Ser Phe Ser Ser Gln Pro
 180 185 190

Leu Ser Gly Gly Glu Gly Leu Gln Ser Tyr Gln Leu Ala Ser Cys Gly
 195 200 205

Gln Asp Cys Glu Ile Lys Leu Trp Ala Val Thr Ile Thr Arg Val Leu
 210 215 220

Gly Phe Glu Leu Lys Tyr Lys Ser Thr Leu Ser Gly His Cys Ala Pro
 225 230 235 240

Val Leu Ala Cys Ala Phe Ser His Asp Gly Lys Met Leu Ala Ser Gly
 245 250 255

Ser Val Asp Lys Ser Val Ile Ile His Gly Ile Gly Pro Gln Ser Val
 260 265 270

Leu His Thr Leu Thr Gln His Thr Arg Tyr Val Thr Thr Cys Ala Phe
 275 280 285

Ala Pro Asn Thr Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser Met Asp Lys Thr Val
 290 295 300

Asn Ile Trp Gln Phe Asp Leu Glu Thr Pro Cys Gln Ala Gly Ser Met
 305 310 315 320

Asn Asp Pro Leu Lys His Phe Thr Glu Glu Trp Ser Glu Glu Asp Val
 325 330 335

Ser Val Trp Leu Arg Ala Gln Gly Leu Glu Asp Leu Val Gly Ile Phe
 340 345 350

WO 02/066494

PCT/US02/05162

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ala | Asn | Asn | Ile | Asp | Gly | Lys | Glu | Leu | Leu | His | Leu | Thr | Lys | Glu |
| | 355 | | | | | | 360 | | | | | | | 365 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Ala | Gly | Asp | Leu | Lys | Ile | Glu | Ser | Leu | Gly | Leu | Arg | Ser | Lys |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | | 380 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Leu | Arg | Ser | Ile | Glu | Glu | Leu | Arg | Ala | Lys | Met | Asp | Ser | Leu | Ser |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | 400 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ile | Pro | Asp | Glu | Phe | Ile | Cys | Pro | Ile | Thr | Arg | Glu | Leu | Met |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Asp | Pro | Val | Ile | Ala | Ser | Asp | Gly | Tyr | Ser | Tyr | Glu | Arg | Glu | Ala |
| | | 420 | | | | | | | 425 | | | | | | 430 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Ser | Trp | Ile | His | Lys | Lys | Lys | Arg | Thr | Ser | Pro | Met | Thr | Asn |
| | 435 | | | | | | | 440 | | | | | | | 445 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ala | Leu | Pro | Ser | Leu | Val | Leu | Thr | Pro | Asn | Arg | Thr | Leu | Lys | Met |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | | | | | 460 |

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ile | Asn | Arg | Trp | Leu | Glu | Thr | His | Glu | Lys |
| | 465 | | | | 470 | | | | | 475 |

<210> 8

<211> 520

<212> DNA

<213> RAT

<400> 8

```

tgacgagttc atctgccc aa taaccaggga acttatgaag gaccccgta tcgcatcaga 60
tggctactcc tacgagagag aagcaatgga gacttggatc cacaagaaga agcgacgag 120
ccccatgaca aacttggctc ttecttca ct gytactgacc ccaaacagga ctctgaaat 180
ggccatcaat cgatggctag agacgcatca gaagtgaacc tgcccacagg catcgggtac 240
actgtcagtg atgcccctca gatgattcaa aatgctaagc agccattaca gaagcaata 300
aaaggggaagg acagaagtta aatccagtta cttttaaaaa ctgtaactg taagcaggtta 360
agtgggtggcg cacacottta atcccagcac tcaggaggca gaggcaggtg ggtctccatg 420
aattccaggc cagcctggtc tatagggcga gticcaggac ggcaaggcta cacagagaaa 480
cctgtctca aaaacctaaa agcaaaaaa aaaaaaaaaa 520

```

<210> 9

<211> 71

<212> PRT

<213> RAT

<400> 9

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Asp Glu Phe Ile Cys Pro Ile Thr Arg Glu Leu Met Lys Asp Pro Val
 1 5 10 15
 Ile Ala Ser Asp Gly Tyr Ser Tyr Glu Arg Glu Ala Met Glu Ser Trp
 20 25 30
 Ile His Lys Lys Lys Arg Thr Ser Pro Met Thr Asn Leu Ala Leu Pro
 35 40 45
 Ser Leu Val Leu Thr Pro Asn Arg Thr Leu Lys Met Ala Ile Asn Arg
 50 55 60
 Trp Leu Glu Thr His Gln Lys
 65 70

<210> 10

<211> 1356

<212> PRT

<213> Podospora anserina

<220>

<223> beta transducin-like protein encoded by the
 het-e-1 gene

<400> 10

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

WO 02/066494

PCT/US02/05162

370 375 380

Cys Glu Ile Phe Thr Ser Ile Leu Gln Asp Pro Gly Leu Arg Met Thr
385 390 395 400

Tyr Leu Ile Ile Asp Ala Leu Asp Glu Cys Val Thr Asp Leu Pro Gln
 405 410 415

Leu Leu Glu Leu Ile Thr Arg Thr Ser Cys Thr Ser Ser Pro Ile Lys
 420 425 430

Trp Ile Val Ser Ser Arg Asn Trp Pro Asp Ile Glu Glu Gln Leu Glu
 435 440 445

Thr Ala Thr Gln Lys Ala Arg Leu Ser Leu Glu Leu Asn Ala Glu Ser
 450 455 460

Ile Ser Thr Ala Val Asn Ala Phe Ile Gln Asn Arg Ile Asp Gln Leu
465 470 475 480

Ala Pro Lys Thr Lys His Asp Ala Asn Met Ile Gly Lys Ile Arg Asp
 485 490 495

Tyr Leu His Ser His Ala Asn Gly Thr Phe Leu Trp Val Ala Leu Val
 500 505 510

Cys Gln Ala Leu Ala Asp Pro Lys Val Lys Lys Arg His Ile Leu Ala
 515 520 525

Lys Leu Gln Thr Phe Pro Arg Gly Leu Asp Ser Leu Tyr Ala Arg Met
 530 535 540

Leu Glu Gln Ile Gly His Ser Glu Asp Ala Glu Leu Cys Lys Gln Ile
545 550 555 560

Leu Ala Val Ala Ala Ala Val Arg Arg Pro Ile Ser Leu Asp Glu Leu
 565 570 575

Ala Ser Leu Val Glu Met Pro Asp Asp Val Ser Asp Asp Pro Glu Ser
 580 585 590

Leu Glu Glu Ile Val Lys Leu Cys Gly Ser Phe Leu Ile Ile Arg Glu
 595 600 605

Arg Thr Val Tyr Phe Val His Gln Ser Ala Lys Asp Phe Leu Leu Gly
 610 615 620

Thr Ala Ser Asp Lys Ala Ser Asn Lys Ala Ser Gln Glu Ala Phe Glu

WO 02/066494 PCT/US02/05162

625 630 635 640

Leu Val Phe Pro Thr Gly Ile Glu Asp Val Ser Tyr Ile Ile Phe Trp
645 650 655

Arg Ser Leu Asn Val Met Ser Gln Lys Leu Arg Arg Asp Ile Tyr Cys
660 665 670

Leu Asn Ala Pro Gly Phe Leu Ile Asp Asn Val Arg Val Pro Asp Pro
675 680 685

Asp Pro Leu Ala Thr Val Arg Tyr Ser Cys Ile Tyr Trp Ile Asp His
690 695 700

Leu Arg Asp Leu Val Ser Ser Thr Ser Ser Lys Trp Val His Leu Leu
705 710 715 720

Gln Asp Asp Gly Asp Ile His Arg Phe Leu Thr Thr Lys Tyr Leu Tyr
725 730 735

Trp Leu Glu Ala Leu Ser Leu Leu Arg Ala Leu Pro Glu Gly Ile Asn
740 745 750

Ala Ile Arg Gln Leu Glu Ser Leu Leu Gly His Thr Ile Arg Gly Arg
755 760 765

Leu Ile Ala Ile Val Arg Asp Gly Tyr Arg Phe Ala Leu Ser Tyr Arg
770 775 780

Met Ile Ile Glu Lys Ala Pro Leu Gln Ala Tyr Thr Ser Ala Leu Val
785 790 795 800

Phe Ala Pro Thr Asp Ser Met Ile Lys Lys Ile Phe Lys Lys Glu Glu
805 810 815

Pro Gly Trp Ile Ser Thr Ile Ser Val Val Glu Ala Glu Trp Asn Ala
820 825 830

Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Ser Ser Val Leu Ser Val Ala
835 840 845

Phe Ser Ala Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser Asp Asp Lys Thr
850 855 860

Ile Lys Ile Trp Asp Thr Ala Ser Gly Thr Gly Thr Gln Thr Leu Glu
865 870 875 880

Gly His Gly Gly Ser Val Trp Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp Arg Glu

WO 02/066494

PCT/US02/05162

| | | | | | |
|---|------|--|------|--|------|
| | 885 | | 890 | | 895 |
| Arg Val Ala Ser Gly Ser Asp Asp Lys Thr Ile Lys Ile Trp Asp Ala | | | | | |
| | 900 | | 905 | | 910 |
| Ala Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Gly Arg Val | | | | | |
| | 915 | | 920 | | 925 |
| Gln Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser | | | | | |
| | 930 | | 935 | | 940 |
| Asp Asp His Thr Ile Lys Ile Trp Asp Ala Ala Ser Gly Thr Cys Thr | | | | | |
| | 945 | | 950 | | 955 |
| Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Ser Ser Val Leu Ser Val Ala Phe Ser | | | | | |
| | 965 | | 970 | | 975 |
| Pro Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser Gly Asp Lys Thr Ile Lys | | | | | |
| | 980 | | 985 | | 990 |
| Ile Trp Asp Thr Ala Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His | | | | | |
| | 995 | | 1000 | | 1005 |
| Gly Gly Ser Val Trp Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp Gly Gln Arg Val | | | | | |
| | 1010 | | 1015 | | 1020 |
| Ala Ser Gly Ser Asp Asp Lys Thr Ile Lys Ile Trp Asp Thr Ala Ser | | | | | |
| | 1025 | | 1030 | | 1035 |
| Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Gly Trp Val Gln Ser | | | | | |
| | 1045 | | 1050 | | 1055 |
| Val Val Phe Ser Pro Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser Asp Asp | | | | | |
| | 1060 | | 1065 | | 1070 |
| His Thr Ile Lys Ile Trp Asp Ala Val Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr | | | | | |
| | 1075 | | 1080 | | 1085 |
| Leu Glu Gly His Gly Asp Ser Val Trp Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp | | | | | |
| | 1090 | | 1095 | | 1100 |
| Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser Ile Asp Gly Thr Ile Lys Ile Trp | | | | | |
| | 1105 | | 1110 | | 1115 |
| Asp Ala Ala Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Gly | | | | | |
| | 1125 | | 1130 | | 1135 |
| Trp Val His Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser | | | | | |

WO 02/066494

PCT/US02/05162

1140 1145 1150
 Gly Ser Ile Asp Gly Thr Ile Lys Ile Trp Asp Ala Ala Ser Gly Thr
 1155 1160 1165
 Cys Thr Gln Thr Leu Glu Gly His Gly Gly Trp Val Gln Ser Val Ala
 1170 1175 1180
 Phe Ser Pro Asp Gly Gln Arg Val Ala Ser Gly Ser Ser Asp Lys Thr
 1185 1190 1195 1200
 Ile Lys Ile Trp Asp Thr Ala Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Glu
 1205 1210 1215
 Gly His Gly Gly Trp Val Gln Ser Val Ala Phe Ser Pro Asp Gly Gln
 1220 1225 1230
 Arg Val Ala Ser Gly Ser Ser Asp Asn Thr Ile Lys Ile Trp Asp Thr
 1235 1240 1245
 Ala Ser Gly Thr Cys Thr Gln Thr Leu Asn Val Gly Ser Thr Ala Thr
 1250 1255 1260
 Cys Leu Ser Phe Asp Tyr Thr Asn Ala Tyr Ile Asn Thr Asn Ile Gly
 1265 1270 1275 1280
 Arg Ile Gln Ile Ala Thr Ala Thr Met Glu Ser Leu Asn Gln Leu Ser
 1285 1290 1295
 Ser Pro Val Cys Tyr Ser Tyr Gly Leu Gly Gln Asp His Arg Trp Ile
 1300 1305 1310
 Thr Cys Asn Asn Gln Asn Val Leu Trp Leu Pro Pro Glu Tyr His Thr
 1315 1320 1325
 Ser Ala Phe Thr Met Gln Gly Arg Lys Ile Val Leu Gly Ser Tyr Ser
 1330 1335 1340
 Gly Arg Ile Ile Ile Phe Leu Phe Ser Arg Asp Val
 1345 1350 1355

<210> 11
 <211> 742
 <212> PRT
 <213> Thermomonospora curvata
 <220>

WO 02/066494

PCT/US02/05162

<223> amino acid sequence encoded by the PKWA gene

<400> 11

```

Met Ile Glu Pro Leu Gln Pro Gly Asp Pro Gly Arg Ile Gly Pro Tyr
  1           5           10           15

Arg Leu Val Ser Arg Leu Gly Ala Gly Gly Met Gly Gln Val Phe Leu
          20           25           30

Ala Arg Ser Pro Gly Gly Arg Pro Val Val Val Lys Val Ile Leu Pro
          35           40           45

Glu Tyr Ala Asn Asp Asp Glu Tyr Arg Ile Arg Phe Ala Arg Glu Val
          50           55           60

Glu Ala Ala Arg Arg Val Gly Gly Phe His Thr Ala Gln Val Ile Asp
          65           70           75           80

Ala Asp Pro Thr Ala Asp Pro Pro Trp Met Ala Thr Ala Tyr Ile Pro
          85           90           95

Gly Pro Ser Leu Arg Lys Ala Val Thr Glu Arg Gly Pro Leu Tyr Gly
          100          105          110

Asn Asn Leu Arg Thr Leu Ala Ala Gly Leu Val Glu Gly Leu Ala Ala
          115          120          125

Ile His Ala Cys Gly Leu Val His Arg Asp Phe Lys Pro Ser Asn Ile
          130          135          140

Val Leu Ala Ala Asp Gly Pro Arg Val Ile Asp Phe Gly Val Ala Arg
          145          150          155          160

Pro Leu Asp Ser Ser Val Met Thr Gln Ser Gly Ala Val Ile Gly Thr
          165          170          175

Leu Ala Tyr Met Ser Pro Glu Gln Thr Asp Gly Ser Gln Val Gly Pro
          180          185          190

Ala Ser Asp Val Phe Ser Leu Gly Thr Val Leu Ala Phe Ala Ala Thr
          195          200          205

Gly Arg Ser Pro Phe Met Ala Asp Ser Ile Gly Glu Ile Ile Ala Arg
          210          215          220

Ile Ser Gly Pro Pro Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro Asp Asp Leu Arg
          225          230          235          240

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Glu Leu Val Tyr Ala Cys Trp Glu Gln Asn Pro Asp Leu Arg Pro Thr
245 250 255

Thr Ala Glu Leu Leu Ala Gln Leu Ser Thr Asp His Thr Gly Asp Asp
260 265 270

Trp Pro Pro Pro His Leu Ser Asp Leu Ile Gly Ser Met Leu Pro Leu
275 280 285

Gly Ala Thr Thr Ser Pro Asn Pro Ser Leu Ala Ile Glu Pro Pro Pro
290 295 300

Pro Ser His Gly Pro Pro Arg Pro Ser Glu Pro Leu Pro Asp Pro Gly
305 310 315 320

Asp Asp Ala Asp Glu Pro Ser Ala Glu Lys Pro Ser Arg Thr Leu Pro
325 330 335

Glu Pro Glu Pro Pro Glu Leu Glu Glu Lys Pro Ile Gln Val Ile His
340 345 350

Glu Pro Glu Arg Pro Ala Pro Thr Pro Pro Arg Pro Arg Glu Pro Ala
355 360 365

Arg Gly Ala Ile Lys Pro Lys Asn Pro Arg Pro Ala Ala Pro Gln Pro
370 375 380

Pro Trp Ser Pro Pro Arg Val Gln Pro Pro Arg Trp Lys Gln Leu Ile
385 390 395 400

Thr Lys Lys Pro Val Ala Gly Ile Leu Thr Ala Val Ala Thr Ala Gly
405 410 415

Leu Val Val Ser Phe Leu Val Trp Gln Trp Thr Leu Pro Glu Thr Pro
420 425 430

Leu Arg Pro Asp Ser Ser Thr Ala Pro Ser Glu Ser Ala Asp Pro His
435 440 445

Glu Leu Asn Glu Pro Arg Ile Leu Thr Thr Asp Arg Glu Ala Val Ala
450 455 460

Val Ala Phe Ser Pro Gly Gly Ser Leu Leu Ala Gly Gly Ser Gly Asp
465 470 475 480

Lys Leu Ile His Val Trp Asp Val Ala Ser Gly Asp Glu Leu His Thr
485 490 495

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Leu Glu Gly His Thr Asp Trp Val Arg Ala Val Ala Phe Ser Pro Asp
500 505 510

Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Ser Asp Asp Ala Thr Val Arg Leu Trp
515 520 525

Asp Val Ala Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Phe Glu Gly His Thr His
530 535 540

Tyr Val Leu Asp Ile Ala Phe Ser Pro Asp Gly Ser Met Val Ala Ser
545 550 555 560

Gly Ser Arg Asp Gly Thr Ala Arg Leu Trp Asn Val Ala Thr Gly Thr
565 570 575

Glu His Ala Val Leu Lys Gly His Thr Asp Tyr Val Tyr Ala Val Ala
580 585 590

Phe Ser Pro Asp Gly Ser Met Val Ala Ser Gly Ser Arg Asp Gly Thr
595 600 605

Ile Arg Leu Trp Asp Val Ala Thr Gly Lys Glu Arg Asp Val Leu Gln
610 615 620

Ala Pro Ala Glu Asn Val Val Ser Leu Ala Phe Ser Pro Asp Gly Ser
625 630 635 640

Met Leu Val His Gly Ser Asp Ser Thr Val His Leu Trp Asp Val Ala
645 650 655

Ser Gly Glu Ala Leu His Thr Phe Glu Gly His Thr Asp Trp Val Arg
660 665 670

Ala Val Ala Phe Ser Pro Asp Gly Ala Leu Leu Ala Ser Gly Ser Asp
675 680 685

Asp Arg Thr Ile Arg Leu Trp Asp Val Ala Ala Gln Glu Glu His Thr
690 695 700

Thr Leu Glu Gly His Thr Glu Pro Val His Ser Val Ala Phe His Pro
705 710 715 720

Glu Gly Thr Thr Leu Ala Ser Ala Ser Glu Asp Gly Thr Ile Arg Ile
725 730 735

Trp Pro Ile Ala Thr Glu
740

WO 02/066494

PCT/US02/05162

<210> 12
<211> 1272
<212> DNA
<213> HUMAN

<220>
<223> RET 16.2 splice variant

```

<400> 12
gaattggct ttcaactgcg cggcaactga ccgcaccgc ccgtgggca cttgaaggcg 60
gatcccgcc gcccccgc ctgcagctg tttttctca aataaagaac atggtgaaac 120
tgattcacac attagctgat catggtgacg atgtcaactg ctgtgccttc tccctttccc 180
tcttgctac ttgctccttg gacaaaacaa ttcgcctgta ctggttacgt gactttactg 240
aactgcaaca ttctccattg aagtttcata cctatgctgt ccaactgctgc tgtttctccc 300
cttcaggaca tattttggca tctgttcaaa cagatggtac cactgtccta tggaaactg 360
aaaatggaca gatgctggca gtgatggaac agcctagtgg cagccctgtg agggtttgc 420
agttttccc agactccacg tgtttggcat caggggcagc tgatggaact gtggttttgt 480
ggatgcaca gtcatacaaa ttatatagat gtggtagtgt taaagatggc tccctggcgg 540
catgtgcatt ttctcctaag ggaagctctt ttgtcactgg ctccctatgt ggtgatttaa 600
cagctgggca tgataaaatg agtgtctgc atagtgaaaa agcacatgat ctggaatta 660
ccgctgcga tttttctca cagccagttt ctgatggaga acaaggtctt cagtttttcc 720
gactggcacc atgtggctcag gattgccaag tcaaaatttg gattgtttct ttaccata 780
tcttagcaag gcgcacagaa catcagctga agcaatttac cgaagattgg tcagaggagg 840
tcgtctcaac atggctttgt gcacaagatt taaaagatct tgttggatt tcaagatga 900
ataacaltga tggaaaagaa ctggtgaatc ttacaaaaga aagtctggct gatgattga 960
aaattgaatc tctaggactg cgtagttaag tgcagaggaa aattgaagag ctccaggacca 1020
aggttaaatc cctttcttca ggaattcctg atgaatttat atgtccaata actagagaac 1080
ttatgaaaga tcoggtcacc gcacagatg gctatcata tgaaaaggaa gcaatggaan 1140
atgggatcag caaaaagaaa cgtacaagtc ccatgacaaa tcttgttctt ccttcagcgg 1200
tacttacacc aaataggact ctgaaaatgy ccatcaatag atggctggag acacacccaa 1260
agtaagaat tc 1272

```

<210> 13
<211> 384
<212> PRT
<213> HUMAN

<220>
<223> RET 16.2 splice variant

```

<400> 13
Met Val Lys Leu Ile His Thr Leu Ala Asp His Gly Asp Asp Val Asn
1 5 10 15
Cys Cys Ala Phe Ser Phe Ser Leu Leu Ala Thr Cys Ser Leu Asp Lys
20 25 30

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

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

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Gly Leu Arg Ser Lys Val Leu Arg Lys Ile Glu Glu Leu Arg Thr Lys
 290 295 300

Val Lys Ser Leu Ser Ser Gly Ile Pro Asp Glu Phe Ile Cys Pro Ile
 305 310 315 320

Thr Arg Glu Leu Met Lys Asp Pro Val Ile Ala Ser Asp Gly Tyr Ser
 325 330 335

Tyr Glu Lys Glu Ala Met Glu Asn Trp Ile Ser Lys Lys Lys Arg Thr
 340 345 350

Ser Pro Met Thr Asn Leu Val Leu Pro Ser Ala Val Leu Thr Pro Asn
 355 360 365

Arg Thr Leu Lys Met Ala Ile Asn Arg Trp Leu Glu Thr His Gln Lys
 370 375 380

<210> 14
 <211> 1908
 <212> DNA
 <213> HUMAN

<220>
 <223> RET 16.3 splice variant

<400> 14
 gaattcggct cgaggccggc gccgcgccg ccagcctcac ctgcgcggca cgtgaccgc 60
 acgcccgtg ggcacctga aggcggatcc cgcgcgccc cgtcctcga ggtgttttt 120
 cttcaataa agaactgggt gaaactgatt cacacattag ctgatcatgg tgacgatgtc 180
 aactgctgtg ccttctcctt ttccctcctg gctacttgct ccttggacaa aacaattcgc 240
 ctgtactcgt tacgtgactt tactgaactg ccacattctc cattgaagtt tcatacctat 300
 gctgtccact gctgctgttt ctccccttca ggacattatt tggcatcgtg ttcaacagat 360
 ggtaccactg tctatggaa tactgaaaat ggacagatgc tggcagtgat ggaacagcct 420
 agtggcagcc ctgtgagggt ttgccagttt tccccagact ccacgtgttt ggcacaggg 480
 gcagctgatg gaactgtggt ttgtggaat gcacagtcac acaattata tagatgtggt 540
 agtgttaaag atggtcctt ggcgccatgt gcattttctc ctaatggaag cttctttgtc 600
 actggctcct catgtggtga tttaacagtg tgggatgata aaatgaggtg tctgcatagt 660
 gaaaaagcac atgatcttgg aattacctgc tgcgattttt cttcacagcc agtttctgat 720
 ggagaacaag gtcttcagtt ttttcgactg gcacatgtg gtcaggaltg ccaagtcaaa 780
 atttggattg tttcttttac ccatatctta ggttttgaat taaaatataa aagtacactg 840
 agtgggcact gtgctcctgt tctggcttgt gctttttccc atgatggga gatgctagtc 900
 tcagggtcag tggataagtc tgtcatagta tatgatacta atactgagaa tatacttcac 960

WO 02/066494

PCT/US02/05162

```

acattgactc agcacaccag gtatgtcaca acttgtgctt ttgcacctaa taccccttta 1020
cttgcactcy gttcaatgga caaaacagtg aacatctggc aatttgacct ggaacacctt 1080
tgccaagcaa ggcgcacaga acatcagctg aagcaattta ccgaagattg gtcagaggag 1140
gaigtctcaa catggctttg tgcacaagat ttaaaagatc ttgttgggat ttccaagatg 1200
aataacattg atggsaaaaga actggttgaat cttacaaaag aaagtctggc tgatgatttg 1260
aaaattggct ggagtcctct gccatggtea tgcctcactg cagcttcaac ctccctgggt 1320
caagtgatcc tcctacctcg gctcaaatct ctaggactgc gtagtaaatg gctgaggaaa 1380
altgaagagc tcaggaccac ggltaaatcc ctttcttcag gaattcctga tgaatttata 1440
tgtccaataa ctagagaact tatgaaagat ccggtcctcg catcagatgg ctattcatat 1500
gaaaaggaag caatggaaaa ttggatcagc aaaaagaac gtacaagtc catgacaaat 1560
cttgtttctt cttcagcggc acttacacca aataggactc tgaaaatggc catcaataga 1620
tggctggaga cacacccaaa gtaaaattgt tgatattgta ttatttatat ttcagtgat 1680
ctcatttgaa tgatttatag gtaaaacta atcagacatt attaaaagca aaacaggaag 1740
aaggtaaact tcttaaatb agttacctat aaaaattgct aattttcatt ctttaaaaaa 1800
cacatggact tactataaaa gcctttttgt actagtgaag aqaatottca gctatataga 1860
aataaagtta tcctttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagg gggccgc 1908

```

```

<210> 15
<211> 502
<212> PRT
<213> HUMAN

```

```

<220>
<223> RBT 16.3 splice variant

```

```

<400> 15
Met Val Lys Leu Ile His Thr Leu Ala Asp His Gly Asp Asp Val Asn
 1             5             10             15

Cys Cys Ala Phe Ser Phe Ser Leu Leu Ala Thr Cys Ser Leu Asp Lys
          20             25             30

Thr Ile Arg Leu Tyr Ser Leu Arg Asp Phe Thr Glu Leu Pro His Ser
          35             40             45

Pro Leu Lys Phe His Thr Tyr Ala Val His Cys Cys Cys Phe Ser Pro
          50             55             60

Ser Gly His Ile Leu Ala Ser Cys Ser Thr Asp Gly Thr Thr Val Leu
          65             70             75             80

Trp Asn Thr Glu Asn Gly Gln Met Leu Ala Val Met Glu Gln Pro Ser
          85             90             95

Gly Ser Pro Val Arg Val Cys Gln Phe Ser Pro Asp Ser Thr Cys Leu
          100            105            110

```

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Ala Ser Gly Ala Ala Asp Gly Thr Val Val Leu Trp Asn Ala Gln Ser
 115 120 125

Tyr Lys Leu Tyr Arg Cys Gly Ser Val Lys Asp Gly Ser Leu Ala Ala
 130 135 140

Cys Ala Phe Ser Pro Asn Gly Ser Phe Phe Val Thr Gly Ser Ser Cys
 145 150 155 160

Gly Asp Leu Thr Val Trp Asp Asp Lys Met Arg Cys Leu His Ser Glu
 165 170 175

Lys Ala His Asp Leu Gly Ile Thr Cys Cys Asp Phe Ser Ser Gln Pro
 180 185 190

Val Ser Asp Gly Glu Gln Gly Leu Gln Phe Phe Arg Leu Ala Ser Cys
 195 200 205

Gly Gln Asp Cys Gln Val Lys Ile Trp Ile Val Ser Phe Thr His Ile
 210 215 220

Leu Gly Phe Glu Leu Lys Tyr Lys Ser Thr Leu Ser Gly His Cys Ala
 225 230 235 240

Pro Val Leu Ala Cys Ala Phe Ser His Asp Gly Gln Met Leu Val Ser
 245 250 255

Gly Ser Val Asp Lys Ser Val Ile Val Tyr Asp Thr Asn Thr Glu Asn
 260 265 270

Ile Leu His Thr Leu Thr Gln His Thr Arg Tyr Val Thr Thr Cys Ala
 275 280 285

Phe Ala Pro Asn Thr Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ser Met Asp Lys Thr
 290 295 300

Val Asn Ile Trp Gln Phe Asp Leu Glu Thr Leu Cys Gln Ala Arg Arg
 305 310 315 320

Thr Glu His Gln Leu Lys Gln Phe Thr Glu Asp Trp Ser Glu Glu Asp
 325 330 335

Val Ser Thr Trp Leu Cys Ala Gln Asp Leu Lys Asp Leu Val Gly Ile
 340 345 350

Phe Lys Met Asn Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Leu Asn Leu Thr Lys
 355 360 365

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Glu Ser Leu Ala Asp Asp Leu Lys Ile Gly Trp Ser Pro Leu Ala Trp
 370 375 380

Ser Cys Leu Thr Ala Ala Ser Thr Ser Trp Ala Gln Val Ile Leu Leu
 385 390 395 400

Pro Arg Pro Gln Ser Leu Gly Leu Arg Ser Lys Val Leu Arg Lys Ile
 405 410 415

Glu Glu Leu Arg Thr Lys Val Lys Ser Leu Ser Ser Gly Ile Pro Asp
 420 425 430

Glu Phe Ile Cys Pro Ile Thr Arg Glu Leu Met Lys Asp Pro Val Ile
 435 440 445

Ala Ser Asp Gly Tyr Ser Tyr Glu Lys Glu Ala Met Glu Asn Trp Ile
 450 455 460

Ser Lys Lys Lys Arg Thr Ser Pro Met Thr Asn Leu Val Leu Pro Ser
 465 470 475 480

Ala Val Leu Thr Pro Asn Arg Thr Leu Lys Met Ala Ile Asn Arg Trp
 485 490 495

Leu Glu Thr His Gln Lys
 500

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 11587
 oligonucleotide

<400> 16
 gcacagccgc caaggagcca c 21

<210> 17
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer, JNF

WO 02/066494

PCT/US02/05162

346

<400> 17
tcacctgccc gccacgtgac cc

22

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer, JNF
493

<400> 18
tttacttttg gtgtgtctcc agcc

24

<210> 19
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer, JNF
494

<400> 19
ttacttttgg tgtgtctcca gccatctatt gatggc

36

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer, JNF
232

<400> 20
ggcagatgct agtctcaggg

20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA

WO 02/066494

PCT/US02/05162

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer, JNF
233

<400> 21

gggatttaac cttggtcctg

20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide, 11590

<400> 22

gcacacacgc agccagaga

19

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide, 11591

<400> 23

agagaccgac gcacacacg

19

<210> 24

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: U box domain
of BET16

<400> 24

Glu Phe Ile Cys Pro Ile Thr Arg Glu Leu Met Lys Asp Pro Val Ile
1 5 10 15

WO 02/066494

PCT/US02/05162

Ala Ser Asp Gly Tyr Ser Tyr Glu Lys Glu Ala Met Glu Asn Trp Ile
 20 25 30

Ser Lys Lys Lys Arg Thr Ser Pro Met Thr Asn Leu Val Leu Pro Ser
 35 40 45

Ala Val
 50

<210> 25

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: U box domain of PRP19

<400> 25

Met Leu Cys Ala Ile Ser Gly Lys Val Pro Arg Arg Pro Val Leu Ser
 1 5 10 15

Pro Lys Ser Arg Thr Ile Phe Glu Lys Ser Leu Leu Glu Gln Tyr Val
 20 25 30

Lys Asp Thr Gly Asn Asp Pro Ile Thr Asn Glu Pro Leu Ser Ile Glu
 35 40 45

Glu Ile Val Glu
 50

WO 02/066494

PCT/US02/05162

UNITED STATES RECEIVING OFFICE (ROUS) FEE CODING AND RECORDING SHEET Form 10/02

IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

International application No. _____ International filing date (day/month/year) _____

Applicant (Name) _____

| PAYMENTS | | | | REFUNDS | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|--|
| Payment on Filing | | Deposit Account | Deposit Account | To Deposit Account | To Deposit Account | | |
| Deposit Account | Date | Date | Date | Date | | | |
| <input type="checkbox"/> CASH/CHECK | | <input type="checkbox"/> CASH/CHECK | <input type="checkbox"/> CASH/CHECK | <input type="checkbox"/> BY CHECK | <input type="checkbox"/> BY CHECK | | |
| USD | | | | | | | |
| EUR | | | | | | | |
| GBP | | | | | | | |
| JPY | | | | | | | |
| CHF | | | | | | | |
| INR | | | | | | | |
| SGD | | | | | | | |
| THB | | | | | | | |
| USD | Total Paid: | Total Paid: | Total Paid: | Total Refunded: | Total Refunded: | | |
| | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | | |
| States Included for 892: | 892: | 892: | | | | | |
| States Included for 893: | 893: | 893: | | | | | |

CALCULATED FEE AMOUNT - AMOUNT OF DIFFERENCE -

| | |
|--|--|
| 03/01/2002 US 00000185 134500 PCT/US02/05162 01 FC:150 240.00 CH 02 FC:151 700.00 CH 03 FC:890 497.00 CH 04 FC:891 1336.00 CH 05 FC:899 440.00 CH 06 FC:566 30.00 CH | |
|--|--|

ROUS Authentication _____ ROUS Authentication _____ ROUS Authentication _____ ROUS Authentication _____ ROUS Authentication _____

Form PCT/RO/1029 (U.S. VERSION) (Rev. 07-99) U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE - Patent and Trademark Office

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau



(43) International Publication Date 29 August 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number WO 02/066494 A2

- (51) International Patent Classification: C07K
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): TODDERUD, C., Gordon (US/US); 56 Autumn Drive, Newtown, PA 18940 (US); FINGER, Joshua, N. (US/US); Apartment 254, 222 Woodland Parkway, San Marcos, CA 92069 (US); RILLEMA, Jill (US/US); 18C Ixert Court, Princeton, NJ 08540 (US).
(21) International Application Number: PCT/US02/05162
(22) International Filing Date: 15 February 2002 (15.02.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/269,366 16 February 2001 (16.02.2001) US; 60/294,181 29 May 2001 (29.05.2001) US
(74) Agent: KLEIN, Christopher, A.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Lawrenceville-Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (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 (utility model), DL, DK, DM, DZ, EC, EL, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, PT.

[Continued on next page]

(54) Title: IDENTIFICATION AND CLONING OF A NOVEL HUMAN GENE, RET16, INVOLVED IN THE INTRACELLULAR SIGNALING CASCADE



WO 02/066494 A2

1 gcttcttccc tctgtcttgg gctctccgag gggcccgccc cgcagccttc
21 aactgggggg ccaagggaacc gcaacggccg cgggaacctt gaagggggat
101 cccggggggg cccggtcttg cgggtctttt tttctcaaal aaagaatag
151 gggaaatgta ttcacacatc agctgatact gggcagctg tcaatgtgtg
201 tggctctccc tcttctctct tggctctctg ctctctggag aaaaactctc
251 cctctctacc gttctgggac tttaetgaa cgcacatcc tcaactgag
301 tttcatcct atgelycca tggctgtgt tttccctct caggcaatc
351 ttggacccg ttttcaagc atggaaacc tgcctctag aactctgaaa
401 atggacgat gttggcagtg atggaaagc atggggccg cctctggag
451 gtttgcagc tttcccgag ctacacgat ttggatcag gggcctga
501 tggatctgg attttggg atggacgpc atcaaatla tcaaatgtg
551 gaaagttaa agatgcttc ttggagcat gtcatttcc tctaatgga
601 agtltcttg tcaatggct ctactgtgt gatttaacg tggggatga
651 taaatggg tgcctgata gtaaaaagc aactgtctt ggtctactc
701 gctggctt tttctcaag caagtctcg atggaaacc agttctcag
751 tcttttgcac tggcatcag tggcaggt tgcacagca aattctggat
801 tgttctctt accacatct tgggtttga attaaatc aaagaccc
851 tggctggca cctgtctct gttgtgctt gctcttcc caatgtggg
901 cagatgtag tctcagacc tgggataag tctgtcag taatgatcc
951 tcaatctag atatacttc accatctgc tggccccc agatctgca
1001 caactctgc tttgcauc ataaccttc taatctgac tggctcag
1051 gcaaaaagc tgaatctg caattctgc atgaaacc tttgcagc
1101 ggggaccc caacatcgc tggagcaat tcaatgat tggctggg
1151 agatcttc aactgctt tttctcag atttaaaa tctgtctgt
1201 atttcaaga tgaatacat tgaaggaaa gaotgttg atttcaaaa
1251 agatctcga cctgagat taaaatga atctctgga ctgtrtcta
1301 caatctgag caaatctga tgcctcaga caagctta atctcttc
1351 tcaagatcc cagatgatt tatatctca atactagag aactatgaa
1401 agatctgca ctgctcag atggcaatt atctgaaag gaagcaatg
1451 aactctgct cagcaaaa gaaagctaa ctctctgca aactctgtt
1501 ctctctcag agtcaatc accaatag auctgaaa tggcccaaa
1551 tggctggc gaaacaccc aaagctaaa tctctgat tgaattatc
1601 atctctcag tgaatctt agatgctt ataatctt atcaatgga
1651 cactataa agcaaacag gaaaggtta aactcttaa atctgtta
1701 ctatataat tgcacatct cactctta aaacacag gaactctat
1751 aaagcttt tggctcag gaaagatc tcaatgca tgaatata
1801 ctatctct aaaaaaa

(57) Abstract: The present invention describes a newly discovered polynucleotide encoding a protein involved in the cell signaling cascade, called RET16, cloned, isolated and identified from TNF-alpha stimulated human microvascular endothelial cells, as well as mouse and rat RET16 orthologs thereof. Also described are the RET16 polypeptide sequence, expression vectors, host cells, agonists, antagonists, antisense molecules, and antibodies related to the polynucleotide and/or polypeptide of the present invention. Methods for screening for modulators, particularly inhibitors, of the human RET16 protein, and use of the RET16 polynucleotide and polypeptide for therapeutics and diagnostics are described.

WO 02/066494 A2 

RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

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

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

(48) Date of publication of this corrected version:

23 October 2003

(15) Information about Correction:

see PCT Gazette No. 43/2003 of 23 October 2003, Sec-
tion II

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

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 11/06 | A 6 1 P 17/06 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 P 17/06 | A 6 1 P 19/02 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 19/02 | A 6 1 P 19/04 | |
| A 6 1 P 19/04 | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 25/00 | A 6 1 P 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 29/00 | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/00 | A 6 1 P 37/06 | |
| A 6 1 P 37/06 | C 0 7 K 14/47 | |
| C 0 7 K 14/47 | C 0 7 K 16/18 | |
| C 0 7 K 16/18 | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/15 | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/19 | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 1/21 | C 1 2 P 21/02 | C |
| C 1 2 N 5/10 | C 1 2 Q 1/02 | |
| C 1 2 P 21/02 | C 1 2 Q 1/48 | Z |
| C 1 2 Q 1/02 | C 1 2 Q 1/68 | A |
| C 1 2 Q 1/48 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| C 1 2 Q 1/68 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/53 | M |
| G 0 1 N 33/50 | G 0 1 N 33/566 | |
| G 0 1 N 33/53 | C 1 2 N 5/00 | A |
| G 0 1 N 33/566 | A 6 1 K 37/02 | |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シー・ゴードン・トッデラッド

アメリカ合衆国 1 8 9 4 0 ペンシルベニア州ニュータウン、オータム・ドライブ 5 6 番

(72) 発明者 ジョシュア・エヌ・フィンガー

アメリカ合衆国 9 2 0 7 8 カリフォルニア州サン・マルコス、ピア・デル・カバロ 5 3 8 番

(72) 発明者 ジル・リレマ

アメリカ合衆国 9 4 0 0 2 カリフォルニア州ベルモント、パイン・ノール・ドライブ 1 5 0 9 番

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36

FB02

4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 GA11 HA20

4B063 QA05 QA18 QQ42 QQ91 QR32 QR55 QR77 QS28 QS34 QS40

QX01

4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 BA01 BA22 DC50 NA14 ZB261

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2004532619A5 | 公开(公告)日 | 2005-12-22 |
| 申请号 | JP2002566207 | 申请日 | 2002-02-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 百时美施贵宝公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司 | | |
| [标]发明人 | シーゴードントツデラッド ジョシュアエヌフィンガー ジルリレマ | | |
| 发明人 | シー・ゴードン・トツデラッド ジョシュア・エヌ・フィンガー ジル・リレマ | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K38/00 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33 /566 | | |
| CPC分类号 | A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 C07K14/47 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045 /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063 /QR55 4B063/QR77 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS40 4B063/QX01 4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB261 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 品川EiSatoshi | | |
| 优先权 | 60/269366 2001-02-16 US 60/294181 2001-05-29 US | | |
| 其他公开文献 | JP2004532619A | | |

摘要(译)

本发明描述了新发现的多核苷酸，其编码参与细胞信号级联反应的蛋白质，称为RET16，其是从TNF- α 刺激的人微血管内皮细胞及其小鼠和大鼠RET16直系同源物中克隆，分离和鉴定的。还描述了与本发明的多核苷酸和/或多肽有关的RET16多肽序列，表达载体，宿主细胞，激动剂，拮抗剂，反义分子和抗体。描述了筛选人RET16蛋白的调节剂，特别是抑制剂的方法，以及RET16多核苷酸和多肽在治疗和诊断中的用途。

