

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-507638

(P2005-507638A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	2 G O 4 5
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/16	4 B O 2 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 3
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00	4 B O 6 4
		4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 188 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-570685 (P2002-570685)	(71) 出願人	500311819
(86) (22) 出願日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)		ミレニウム ファーマシューティカルズ, インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月29日 (2003. 8. 29)		アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチュー セッツ州, ケンブリッジ, シドニー スト リート 7 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/006455	(74) 代理人	100091731
(87) 国際公開番号	W02002/070657		弁理士 高木 千嘉
(87) 国際公開日	平成14年9月12日 (2002. 9. 12)	(74) 代理人	100080355
(31) 優先権主張番号	60/272, 677		弁理士 西村 公佑
(32) 優先日	平成13年3月1日 (2001. 3. 1)	(74) 代理人	100127926
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 結田 純次
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトGタンパク質共役型受容体93870およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、単離した核酸分子、指定された93870核酸分子であって、GPCRをコードするものを提供する。本発明は、アンチセンス核酸分子、93870核酸分子を含む組換え発現ベクター、発現ベクターを導入した宿主細胞、および93870遺伝子を導入しまたは破碎した非ヒトトランスジェニック動物も提供する。本発明はさらに、単離した93870タンパク質、融合タンパク質、抗原ペプチド、および抗93870抗体も提供する。本発明の組成物を利用する診断および治療方法も提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- a. 配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 80% が同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子と、
- b. 配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列の少なくとも 640 ヌクレオチドの断片を含む核酸分子と
- c. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子と、
- d. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの断片をコードする核酸分子であって、断片が、配列番号 2 の少なくとも 263 個の連続するアミノ酸を含むものである核酸分子と、
- e. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの自然に生ずる対立遺伝子変種をコードする核酸分子であって、核酸分子が、ストリンジェントな条件下、配列番号 1 または 3 あるいはその相補体を含む核酸分子にハイブリダイズするものである核酸分子とからなる群から選択された単離核酸分子。

10

【請求項 2】

配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 90% 同一である、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 95% 同一である、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

20

【請求項 4】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの断片をコードし、断片が、配列番号 2 の少なくとも 300 個の連続するアミノ酸を含むものである、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 5】

- a. 配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列を含む核酸と、
- b. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子とからなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 6】

ベクター核酸配列をさらに含む請求項 1 に記載の核酸分子。

30

【請求項 7】

異種ポリペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の核酸分子を含有する宿主細胞。

【請求項 9】

哺乳動物宿主細胞である請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 1 に記載の核酸分子を含有するヒト以外の哺乳動物の宿主細胞。

【請求項 11】

- a. 配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列あるいはその相補体を含む核酸に対して少なくとも 80% が同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチドと、
- b. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの自然に生ずる対立遺伝子変種であって、ポリペプチドが、配列番号 1 または配列番号 3 を含む核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によってコードされるものである変種と、
- c. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの断片であって、配列番号 2 の少なくとも 263 個の連続するアミノ酸を含む断片とからなる群から選択された単離ポリペプチド。

40

【請求項 12】

配列番号 2 の少なくとも 300 個の連続するアミノ酸を含む断片を含む、請求項 11 に記

50

載の単離ポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列あるいはその相補体を含む核酸に対して少なくとも 90% が同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチドを含む、請求項 11 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列あるいはその相補体を含む核酸に対して少なくとも 95% が同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチドを含む、請求項 11 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む請求項 11 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 16】

異種アミノ酸配列をさらに含む請求項 11 に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 11 に記載のポリペプチドに選択的に結合する抗体。

【請求項 18】

モノクローナル抗体である請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

- a . s c F V 断片と、
- b . d c F V 断片と、
- c . F a b 断片と、
- d . F (a b ')₂ 断片と

からなる群から選択された免疫学的に活性な部分を含む請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

抗体が、

- a . キメラ抗体と、
- b . ヒト化抗体と、
- c . ヒト抗体と、
- d . 非ヒト抗体と、
- e . 1 本鎖抗体と

からなる群から選択される、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 21】

- a . 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと、
- b . 配列番号 2 のアミノ酸配列の断片を含むポリペプチドであって、断片が、配列番号 2 の少なくとも 263 個の連続するアミノ酸を含むものであるポリペプチドと
- c . 配列番号 2 のアミノ酸配列、または受入れ番号 __ として A T C C に寄託されたプラスミドの c D N A インサートによってコードされたアミノ酸配列を含む、ポリペプチドの自然に生ずる対立遺伝子変種であって、ポリペプチドが、ストリンジェントな条件下、配列番号 1 または配列番号 3 あるいはその相補体を含む核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によってコードされるものである変種と

からなる群から選択されたポリペプチドを生成するための方法であって、核酸分子が発現する条件下で請求項 8 に記載の宿主細胞を培養することを含む方法。

【請求項 22】

サンプルと、請求項 11 に記載のポリペプチドに選択的に結合する化合物とを接触させること、および

化合物がサンプル中でポリペプチドに結合するか否か判別すること

を含む、サンプル中の請求項 11 に記載のポリペプチドの存在を検出するための方法。

【請求項 23】

ポリペプチドに結合する化合物が抗体である請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

請求項 1 1 に記載のポリペプチドに選択的に結合する化合物と使用説明書とを含むキット。

【請求項 2 5】

サンプルと、核酸分子に選択的にハイブリダイズする核酸プローブまたはプライマーとを接触させるステップと、

核酸プローブまたはプライマーがサンプル中で核酸分子に結合するか否か判別するステップと

を含む、サンプル中の請求項 1 に記載の核酸分子の存在を検出するための方法。

【請求項 2 6】

サンプルが mRNA 分子を含み、サンプルを核酸プローブに接触させる、請求項 2 5 に記載の方法。 10

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載の核酸分子に選択的にハイブリダイズする化合物と使用説明書とを含むキット。

【請求項 2 8】

ポリペプチド、または請求項 1 1 のポリペプチドを発現する細胞と、試験化合物とを接触させるステップと、

ポリペプチドが試験化合物に結合するか否か判別するステップと

を含む、請求項 1 1 に記載のポリペプチドに結合する化合物を同定するための方法。

【請求項 2 9】

試験化合物とポリペプチドとの結合が、 20

a . 試験化合物 / ポリペプチド結合の直接結合による結合の検出と、

b . 競合結合アッセイを使用した結合の検出と、

c . 9 3 8 7 0 で媒介されるシグナル伝達のためのアッセイを使用した結合の検出とからなる群から選択された方法によって検出される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

ポリペプチドの活性をモジュレートするのに十分な濃度で、ポリペプチドまたは請求項 1 1 に記載のポリペプチドを発現する細胞を、ポリペプチドに結合する化合物に接触させることを含む、請求項 1 1 に記載のポリペプチドの活性をモジュレートするための方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 1 に記載のポリペプチドを試験化合物に接触させること、および 30

ポリペプチドの活性に対する試験化合物の影響を決定し、それによってポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を特定すること

を含む、請求項 1 1 に記載のポリペプチドの活性をモジュレートする化合物を特定するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願は、2 0 0 1 年 3 月 1 日に出願した米国仮出願第 6 0 / 2 7 2 , 6 7 7 号の利益を主張するものであり、その内容を参照により本明細書に組み込む。 40

【背景技術】

【0 0 0 2】

G タンパク質共役型受容体 (G P C R) は、ヘテロ三量体 G タンパク質を介して様々な数のリガンドのシグナル伝達を仲介する、7 回膜貫通型ドメインタンパク質である (S t r a d e r , C . D . 他 (1 9 9 4) A n n u . R e v . B i o c h e m . 6 3 : 1 0 1 ~ 1 3 2) 。 G タンパク質共役型受容体 (G P C R) は、G タンパク質およびエフェクタータンパク質 (例えば細胞内酵素やチャネル) と共に、モジュラー・シグナル伝達系の構成要素である。G P C R の細胞外部分にリガンド結合すると、別の G タンパク質が活性化され、別の細胞内エフェクター酵素およびイオン・チャネルの活性がモジュレートされる (G u t k i n d , J . S . (1 9 9 8) J . B i o l . C h e m . 2 7 3 : 1 8 3 9 ~ 1 50

842; Selbie, L. A. および Hill, S. J. (1998) Trends Pharmacol. Sci. 19: 87~93)。

【0003】

Gタンパク質は、
、
、および サブユニットからなるヘテロ三量体タンパク質のファミリーを表し、グアニンヌクレオチドに結合するものである。このようなタンパク質は、通常、細胞表面受容体(例えばGPCR)に結合する。GPCRにリガンド結合した後、コンフォメーションの変化がGタンパク質に伝達され、それにより サブユニットは結合GDP分子をGTP分子に交換し、 サブユニットから解離する。サブユニットのGTP結合形態は、一般にエフェクター変調部分として機能し、サイクリックAMP(例えばアデニル酸シクラーゼの活性化によって)やジアシルグリセロール、イノシトールリン 10
酸など第2のメッセンジャーを産生する。 および サブユニットのより小さい供給源に関連付けられる、20を超える種々のタイプの サブユニットがヒトにおいて知られている。哺乳動物Gタンパク質の例には、G_i、G_o、G_q、G_s、およびG_tが含まれる(Lodish H.他、Molecular Cell Biology (Scientific American Books Inc.、New York、N.Y.、1995))。

【0004】

GPCRは、内分泌系、中枢神経系、および末梢生理的プロセスを含めたいくつかの系に極めて重要なものである。GPCR遺伝子および遺伝子産生物は、疾病の原因物質とも考えられている(Spiegel他(1993)J. Clin. Invest. 92: 11 20
19~1125; McKusickおよびAmberger(1993)J. Med. Genet. 30: 1~26)。GPCRの重要な生物学的役割および性質から、そのようなタンパク質をコードする新規な遺伝子を同定すると共に、正常および/または異常な様々な細胞プロセスを調節するのに使用される分子のモジュレーターを発見することが求められている。

【非特許文献1】

Strader, C. D. 他(1994)Annu. Rev. Biochem. 63: 101~132

【非特許文献2】

Gutkind, J. S. (1998)J. Biol. Chem. 273: 1839~1 30
842

【非特許文献3】

Selbie, L. A. および Hill, S. J. (1998) Trends Pharmacol. Sci. 19: 87~93

【非特許文献4】

Lodish H. 他、Molecular Cell Biology (Scientific American Books Inc.、New York、N.Y.、1995)

【非特許文献5】

Spiegel他(1993)J. Clin. Invest. 92: 1119~1125 40

【非特許文献6】

McKusickおよびAmberger(1993)J. Med. Genet. 30: 1~26

【非特許文献7】

http://www.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/ReqProdomII.pl?id_dom0=PD000009&prodom_release=2000.1

【非特許文献8】

<http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/getdesc?name=7tm-1>

【非特許文献 9】

Zagotta W.N. 他、(1996) Annual Rev. Neurosci . 19 : 235 ~ 63

【非特許文献 10】

Dohlman 他 (1991) Annu. Rev. Biochem. 60 : 653 ~ 688

【非特許文献 11】

Juppner 他 (1991) Science 254 : 1024 ~ 1026

【非特許文献 12】

Lin 他 (1991) Science 254 : 1022 ~ 1024

【非特許文献 13】

Nakanishi 他 (1992) Science 258 : 597 ~ 603

【非特許文献 14】

Klein 他 (1998) Science 241 : 1467 ~ 1472

【非特許文献 15】

Kurjan I 他 (1992) Annu. Rev. Biochem. 61 : 1097 ~ 1129

【非特許文献 16】

<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>

【非特許文献 17】

Corpet 他 (1999) Nucl. Acids Res. 27 : 263 ~ 267

【非特許文献 18】

Altschul 他 (1997) Nucleic Acids Res. 25 : 3389 ~ 3402

【非特許文献 19】

Gouzy 他 (1999) Computers and Chemistry 23 : 33 ~ 340

【非特許文献 20】

<http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00210>

【非特許文献 21】

Sonnhammer 他 (1997) Protein 28 : 405 ~ 420

【非特許文献 22】

<http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>

【非特許文献 23】

Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、N.Y. (1989)、6.3.1 ~ 6.3.6

【非特許文献 24】

Needleman および Wunsch (J. Mol. Biol. (48) : 444 ~ 453 (1970))

【非特許文献 25】

<http://www.gcg.com>

【非特許文献 26】

CABIOS、4 : 11 ~ 17 (1989)

【非特許文献 27】

Altschul 他 (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403 ~ 10

【非特許文献 28】

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

10

20

30

40

50

【非特許文献29】

Gaultier 他 (1987) Nucl. Acids. Res. 15: 6625 ~ 6641

【非特許文献30】

Inoue 他 (1987) Nucl. Acids Res. 15: 6131 ~ 6148)

【非特許文献31】

Inoue 他 (197) FEBS Lett. 215: 327 ~ 330

【特許文献1】

米国特許第5,093,246号

【非特許文献32】

Haselhoff 他 (1998) Nature 334: 585 ~ 591

【特許文献2】

米国特許第4,987,071号

【特許文献3】

米国特許第5,116,742号

【非特許文献33】

Bartel 他 (1993) Science 261: 1411 ~ 1418

【非特許文献34】

Helene, 1991, Anticancer Drug Des. 6: 569 ~ 584

【非特許文献35】

Helene 他 (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27 ~ 36

【非特許文献36】

Maher (1992) Bioassays 14: 807 ~ 815

【非特許文献37】

Hyrup 他 (1996) Bioorg. Med. Chem. 4: 5 ~ 23

【非特許文献38】

Perry - O'Keefe 他 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670 ~ 14675

【非特許文献39】

Letsinger 他 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553 ~ 6556

【非特許文献40】

Lemaitre 他 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 684 ~ 652

【特許文献4】

PCT公開番号WO88/09810

【特許文献5】

PCT公開番号WO89/10134

【非特許文献41】

Krol 他 (1998) Bio-Techniques 6: 958 ~ 976

【非特許文献42】

Zon, 1998, Pharm. Res. 5: 539 ~ 549

【特許文献6】

米国特許第5,854,033号

【特許文献7】

米国特許第5,866,336号

【特許文献8】

米国特許第5,876,930号

【非特許文献43】

10

20

30

40

50

- Arkin 他 (1992) Proc. Natl. Acad. USA 89: 7811 ~ 7815
 【非特許文献 44】
- Delgrave 他 (1993) Protein Engr. 6: 327 ~ 331
 【非特許文献 45】
- Colcher 他 (1999) Ann. N. Y. Acad. Sci. 880: 263 ~ 280
 【非特許文献 46】
- Reiter (1996) Clin. Cancer Res. 2: 245 ~ 252
 【非特許文献 47】 10
- Goeddel (1990、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego)
 【非特許文献 48】
- Smith 他 (1988) Gene 67: 31 ~ 40
 【非特許文献 49】
- Gottesman、1990、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、119 ~ 128
 【非特許文献 50】 20
- Wada 他 (1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111 ~ 2118
 【非特許文献 51】
- Pinkert 他 (1987) Genes Dev. 1: 268 ~ 277
 【非特許文献 52】
- Calame 他 (1988) Adv. Immunol. 43: 235 ~ 275
 【非特許文献 53】
- Wino 他 (1989) EMBO J. 8: 729 ~ 733
 【非特許文献 54】
- Banerji 他 (1983) Cell 33: 729 ~ 740
 【非特許文献 55】 30
- Queen 他 (1983) Cell 33: 741 ~ 748
 【非特許文献 56】
- Byrne 他 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473 ~ 5477
 【非特許文献 57】
- Edlund 他 (1985) Science 230: 912 ~ 916
 【特許文献 9】
- 米国特許第 4, 873, 316 号
 【特許文献 10】
- 欧州特許出願公開第 264, 166 号
 【非特許文献 58】 40
- Kessel 他 (1990) Science 249: 374 ~ 379
 【非特許文献 59】
- Campe 他 (1989) Genes Dev. 3: 537 ~ 546
 【非特許文献 60】
- Weintraub, H. 他 (1986) Trends Genet. 1: Review
 【特許文献 11】
- 米国特許第 5, 272, 071 号
 【特許文献 12】
- PCT 公開番号 WO 91 / 06667 50

- 【非特許文献61】
Zuckermann他(1994) J. Med. Chem. 37: 2678 ~ 2685
- 【非特許文献62】
Lam、1997、Anticancer Drug Des. 12: 145
- 【非特許文献63】
DeWitt他(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909
- 【非特許文献64】
Erb他(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422 10
- 【非特許文献65】
Zuckermann他(1994) J. Med. Chem. 37: 2678
- 【非特許文献66】
Cho他(1993) Science 261: 1303
- 【非特許文献67】
Carrell他(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059
- 【非特許文献68】
Carrell他(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061 20
- 【非特許文献69】
Gallop他(1994) J. Med. Chem. 37: 1233
- 【非特許文献70】
Houghten(1992) Biotechniques 13: 412 ~ 421
- 【非特許文献71】
Lam(1991) Nature 354: 82 ~ 84
- 【非特許文献72】
Fodor、1993、Nature 364: 555 ~ 556
- 【特許文献13】
米国特許第5,223,409号 30
- 【非特許文献73】
Cull他(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865 ~ 1869
- 【非特許文献74】
Scott他(1990) Science 249: 386 ~ 390
- 【非特許文献75】
Devlin(1990) Science 249: 404 ~ 406
- 【非特許文献76】
Cwirlla他(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378 ~ 6382 40
- 【非特許文献77】
Felici(1991) J. Mol. Biol. 222: 301 ~ 310
- 【非特許文献78】
McConnell他(1992) Science 257: 1906 ~ 1912
- 【特許文献14】
米国特許第5,631,169号
- 【特許文献15】
米国特許第4,868,103号
- 【非特許文献79】
Sjolander他(1991) Anal. Chem. 63: 2338 ~ 2345 50

【非特許文献80】

Szabo他(1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699~705

【非特許文献81】

Rivas他(1993) *Trends Biochem. Sci.* 18: 284~287

【非特許文献82】

Ausubel他編(1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York

【非特許文献83】

Heegaard, 1998, *J. Mol. Recognit.* 11: 141~148

【非特許文献84】

Hage他(1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 699: 499~525

【特許文献16】

米国特許第4,109,469号

【特許文献17】

米国特許第5,283,317号

【非特許文献85】

Zervos他(1993) *Cell* 72: 223~232

【非特許文献86】

Madura他(1993) *J. Biol. Chem.* 268: 12046~12054

【非特許文献87】

Barthel他(1993) *Biotechniques* 14: 920~924

【非特許文献88】

Iwabuchi他(1993) *Oncogene* 8: 1693~1696

【特許文献18】

PCT公開番号WO94/10300

【非特許文献89】

D'Eustachio他(1983) *Science* 220: 919~924

【非特許文献90】

Fan他(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6223~6227

【非特許文献91】

Verma他(1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York

【非特許文献92】

Johns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能なV. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*

【非特許文献93】

Egeland他, 1987, *Nature*, 325: 783~787

【非特許文献94】

米国特許第5,272,057号

【特許文献19】

米国特許第4,683,202号

【非特許文献95】

Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189~193

10

20

30

40

50

- 【非特許文献96】
Guatelli他(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874 ~ 1878
- 【非特許文献97】
Kwoh他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173 ~ 1177
- 【非特許文献98】
Lizardi他(1988) Bio/Technology 6 : 1197
- 【特許文献20】
米国特許第5,498,531号 10
- 【非特許文献99】
Cronin他(1996) Hum. Mutat. 7 : 244 ~ 255
- 【非特許文献100】
Kozal他(1996) Nature Med. 2 : 753 ~ 759
- 【非特許文献101】
1995、Biotechniques 19 : 448
- 【非特許文献102】
Meyer他(1985) Science 230 : 1242
- 【非特許文献103】
Cotton他(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 4397 20
- 【非特許文献104】
Saleeba他(1992) Meth. Enzymol. 217 : 286 ~ 295
- 【非特許文献105】
Hsu他(1994) Carcinogenesis 15 : 1657 ~ 1662
- 【特許文献21】
米国特許第5,459,039号
- 【非特許文献106】
Orita他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2766 30
- 【非特許文献107】
Cotton(1993) Mutat. Res. 285 : 125 ~ 144
- 【非特許文献108】
Hayashi(1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9 : 73 ~ 79
- 【非特許文献109】
Keen他(1991) Trends Genet 7 : 5
- 【非特許文献110】
Myers他(1985) Nature 313 : 495
- 【非特許文献111】
RosenbaumおよびReissner(1987) Biophys Chem 265 : 12753 40
- 【非特許文献112】
Saiki他(1986) Nature 324 : 163
- 【非特許文献113】
Saiki他(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 6230
- 【非特許文献114】
Gibbs他(1989) Nucl. Acids Res. 17 : 2437 ~ 2448
- 【非特許文献115】 50

- Prossner、1993、Tibtech 11:238
 【非特許文献116】
- Gasparini他(1992)Mol. Cell Probes 6:1
 【非特許文献117】
- Koomen他(2000)J. Mass. Spectrom. 35:258~264
 【非特許文献118】
- James(1994)AIDS Treat. News Arch. 209
 【特許文献22】
- 米国特許第6,033,862号
 【非特許文献119】 10
- Hattis他(1991)Env. Health Perspect. 90:229~238
 【非特許文献120】
- Schentag(1999)Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S21~S24
 【非特許文献121】
- Nicolaou(1999)Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 Suppl. 3:S16~S20
 【非特許文献122】
- McLeod他(1999)Eur. J. Cancer 35:1650~1652 20
 【特許文献23】
- 米国特許第4,522,811号
 【非特許文献123】
- Cruikshank他(1997)J. AIDS Hum. Retrovir. 14:193
 【特許文献24】
- 米国特許第4,676,980号
 【特許文献25】
- 米国特許第5,328,470号
 【非特許文献124】 30
- Chen他(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054~3057
 【非特許文献125】
- Osborne他(1997)Curr. Opin. Chem. Biol. 1:5~9
 【非特許文献126】
- Patel(1997)Curr. Opin. Chem. Biol. 1:32~46
 【非特許文献127】
- Herlyn(1999)Ann. Med. 31:66~78
 【非特許文献128】
- Bhattacharya-Chatterjee他(1998)Cancer Treat. Res. 94:51~68 40
 【非特許文献129】
- Marasco他(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889~7893
 【非特許文献130】
- Ansell他(1996)Curr. Opin. Biotechnol. 7:89~94
 【非特許文献131】
- Shea(1994)Trends Polymer Sci. 2:166~173
 【非特許文献132】 50

V l a t a k i s 他 (1 9 9 3) N a t u r e 3 6 1 : 6 4 5 ~ 6 4 7

【非特許文献133】

K r i z 他 (1 9 9 5) A n a l . C h e m . 6 7 : 2 1 4 2 ~ 2 1 4 4

【非特許文献134】

V a i c k u s , L . (1 9 9 1) C r i t . R e v . i n O n c o l . / H e m o t o l . 1 1 : 2 6 7 ~ 9 7

【非特許文献135】

F i e l d s , H . L . (1 9 8 7) P a i n , N e w Y o r k : M c G r a w - H i l l

【非特許文献136】

E i c h e l b a u m 他 (1 9 9 6) C l i n . E x p . P h a r m a c o l . P h y s i o l . 2 3 : 9 8 3 ~ 9 8 5

【非特許文献137】

L i n d e r 他 (1 9 9 7) C l i n . C h e m . 4 3 : 2 5 4 ~ 2 6 6

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、一部には、Gタンパク質共役型受容体タイプのタンパク質（GPCR）のサブファミリーIに類似する新規なGPCRの発見に基づいており、これを本明細書では「93870」と呼ぶ。93870をコードするcDNAのヌクレオチド配列を配列番号1で示し、93870ポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号2で示す。さらに、コード領域のヌクレオチド配列を配列番号3で示す。

【課題を解決するための手段】

【0006】

したがって一態様で、本発明は、93870タンパク質またはポリペプチド、例えば93870タンパク質の生物学的に活性な部分をコードする核酸分子を特徴とする。好ましい実施形態で、単離核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。その他の実施形態で、本発明は、配列番号1、配列番号3で示されるヌクレオチド配列、および__日に受託番号__でATTCに寄託されたプラスミドのDNAインサートの配列（以下、「寄託済みヌクレオチド配列」）を有する単離93870核酸分子を提供する。

【0007】

さらに別の実施形態で、本発明は、配列番号1、配列番号3、および寄託済み核酸配列で示されるヌクレオチド配列に十分にまたは実質的に同一な（例えば自然発生する対立遺伝子変種）、核酸分子を提供する。その他の実施形態で、本発明は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下、配列番号1、配列番号3、および寄託済みヌクレオチド配列のうち1つのヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする核酸分子であって、核酸が完全長93870タンパク質またはその活性断片をコードする核酸分子を提供する。

【0008】

関連する態様で、本発明は、本明細書で述べる93870核酸分子を含んだ核酸構成をさらに提供する。ある実施形態で、本発明の核酸分子は、天然または異種調節配列に動作可能に結合する。また、本発明の93870核酸分子を含有するベクターおよび宿主細胞、例えばポリペプチドの産生に適するベクターおよび宿主細胞も含まれる。

【0009】

別の関連する態様で、本発明は、93870をコードする核酸を検出するためのプライマーまたはハイブリダイゼーション・プローブとして適切な核酸断片を提供する。

【0010】

さらに別の関連する態様では、93870をコードする核酸分子のアンチセンスである単離核酸分子が提供される。

10

20

30

40

50

【0011】

別の態様で、本発明は、93870で仲介されまたはそれに関する障害、例えば本明細書で述べるGPCR障害などを治療し診断するのに利用可能なアッセイでの試薬や標的として有用な、93870ポリペプチドとその生物学的に活性なまたは抗原性のある断片を特徴とする。別の実施形態で、本発明は、93870活性を有する93870ポリペプチドを提供する。好ましいポリペプチドは、少なくとも1、2、3、4、5、6、または7つの膜貫通ドメインを含む93870タンパク質であり、好ましくは93870活性、例えば本明細書で述べる93870活性を有する93870タンパク質である。好ましいポリペプチドは、少なくとも1つの受容体結合Gタンパク質膜貫通型ドメインを含む93870タンパク質である。

10

【0012】

その他の実施形態で、本発明は、93870ポリペプチド、例えば配列番2で示されるアミノ酸配列またはATCC受託番号__で寄託されたプラスミドのcDNAインサートによりコードされたアミノ酸配列；配列番号2で示されるアミノ酸配列またはATCC受託番号__で寄託されたプラスミドのcDNAインサートによりコードされたアミノ酸配列に十分にまたは実質的に同一なアミノ酸配列；あるいは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド配列、またはATCC受託番号__で寄託されたプラスミドのインサートのヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズされるヌクレオチド配列を有する核酸分子であって、核酸が完全長93870タンパク質またはその活性な断片をコードするものである核酸分子によってコードされたアミノ酸配列を有する93870ポリペプチドを提供する。

20

【0013】

関連する態様で、本発明は、本明細書で述べる93870核酸分子を含む核酸構成をさらに提供する。

【0014】

関連する態様で、本発明は、融合タンパク質を形成するため非93870ポリペプチドに動作可能に結合された93870ポリペプチドまたは断片を提供する。

【0015】

別の態様で、本発明は、93870ポリペプチドと反応し、あるいはより好ましくは93870ポリペプチドに特異的にまたは選択的に結合する抗体およびその抗原結合断片を特徴とする。

30

【0016】

別の態様で、本発明は、93870ポリペプチドまたは核酸の発現または活性をモジュレートする化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0017】

さらに別の態様で、本発明は、例えばスクリーニング済みの化合物を使用して、93870ポリペプチドまたは核酸の発現または活性をモジュレートするためのプロセスを提供する。ある実施形態で、この方法は、異常なまたは不十分な細胞増殖または分化に関連する状態など、93870ポリペプチドまたは核酸の異常な活性または発現に関する状態を治療することを含む。

40

【0018】

また本発明は、疾病の診断も含め、生体サンプル中の93870ポリペプチドまたは核酸分子の活性または存否を決定するためのアッセイも提供する。

【0019】

別の態様で、本発明は、複数のアドレスを有する2次元アレイを特徴とし、複数のアドレスのそれぞれは、複数のアドレスのその他のアドレスそれぞれに対してその位置が区別可能であり、複数のアドレスのそれぞれは、独自の捕捉プローブ、例えば核酸またはペプチド配列を有する。複数のアドレスのうち少なくとも1つのアドレスは、93870分子を認識する捕捉プローブを有する。一実施形態で、捕捉プローブは核酸であり、例えば93870核酸配列に相補的なプローブである。別の実施形態で、捕捉プローブはポリペプチ

50

ドであり、例えば93870ポリペプチドに特異的な抗体である。また、サンプルを前述のアレイに接触させ、サンプルとアレイとの結合を検出することによってサンプルを分析する方法も特徴とする。

【0020】

他の態様で、本発明は、疾病の診断も含め、93870ポリペプチドまたは核酸分子における遺伝子の変化の存否を決定するためのアッセイを提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

非翻訳領域を含む約1684ヌクレオチド長のヒト93870配列(配列番号1)は、終止コドンを含む約942ヌクレオチドの予測メチオニン開始コード配列を含有する(配列番号1のコード化として示されるヌクレオチド;配列番号3)。コード配列は、313アミノ酸タンパク質をコードする(配列番号2)。

10

【0022】

ヒト93870をコードするヌクレオチド配列を含有するプラスミドは、__日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に寄託され、受託番号__が与えられた。この寄託は、特許手続上微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に従って維持されることになる。この寄託は単に当業者の便宜のため行ったもので、寄託が米国特許法第112条により求められていると認めるものではない。

20

【0023】

93870タンパク質には、Gタンパク質共役型受容体ファミリーのメンバーと同様の、特にGタンパク質共役型受容体のサブファミリー1と同様の、いくつかの構造特性がある。本発明のタンパク質および核酸分子について述べる際の「ファミリー」という用語は、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、かつ本明細書で定義される十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列相同性を有する2つ以上のタンパク質または核酸分子を意味する。そのようなファミリー・メンバーは、自然にまたは非自然的に発生させることができ、同じ種または異なる種から形成することができる。例えばファミリーには、ヒト由来の第1のタンパク質ならびにその他の異なるヒト由来のタンパク質を含めることができ、あるいはこれに相当する非ヒト由来の物質、例えばラットやマウスのタンパク質を含めることができる。ファミリーのメンバーは、共通の機能的特性を有してもよい。

30

【0024】

7回膜貫通型タンパク質のGタンパク質共役型受容体ファミリーは、タンパク質の広範囲に及び群であり、例えばホルモンや神経伝達物質、臭気物質、光などによって引き起こされた細胞外シグナルを、グアニンヌクレオチド結合(G)タンパク質との相互作用によって変換する。Gタンパク質共役型受容体のN末端は、一般に膜の細胞外側に位置し、しばしばグリコシル化されており、一方C末端は、細胞質側にあり、一般にリン酸化されている。Gタンパク質共役型受容体は、一般に、7つの疎水性膜スパン型領域を有する。3つの細胞外ループと3つの細胞内ループとは交互に配されて、7つの膜貫通領域を結合する。一部のGタンパク質共役型受容体は、シグナルペプチドを有する。一般に、Gタンパク質共役型受容体の最も保存されている部分は、膜貫通領域および最初の2つの細胞質ループである。保存アルギニン芳香族ダブレットが第2の細胞質ループのN末端先端に存在し、Gタンパク質との相互作用に関与する可能性がある。1308の代表的なGPCRのドメインのアライメントは、http://www.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/ReqProdomII.pl?id_dom0=PD000009&prodom_release=2000.1で見ることができる。したがって本発明の93870タンパク質は、下記の構造的な特徴、すなわちGタンパク質共役型受容体ファミリーには(1)N末端細胞外ドメイン、(2)7つの膜貫通ドメイン、(3)3つの細胞外ループ、(4)3つの細胞質ループであってその1つが保存アルギニン芳香族ダブレットを含むもの、および(5)C末端細胞膜質ドメインが含まれることを

40

50

実証する構造的な特徴を含む。

【0025】

一実施形態で、93870タンパク質は少なくとも1つの細胞外ドメインを含む。N末端ドメインに位置する場合、本明細書ではその細胞外ドメインを、タンパク質のアミノ酸配列内の「N末端細胞外ドメイン」と呼ぶ。本明細書で使用する「N末端細胞外ドメイン」は、長さが約1~100のアミノ酸残基、好ましくは約1~75、より好ましくは約1~50、さらに好ましくは約1~30のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含み、細胞の外側すなわち細胞外に位置する。「N末端細胞外ドメイン」のC末端アミノ酸残基は、自然発生する93870または93870様タンパク質の膜貫通ドメインのN末端アミノ酸残基に隣接する。例えばN末端細胞外ドメインは、配列番号2のアミノ酸残基1~27あたりに位置する。 10

【0026】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドまたはタンパク質は、「N末端細胞外ドメイン」を有し、または少なくとも約1~100、好ましくは約1~50、さらに好ましくは約1~30のアミノ酸残基を含む領域であって「N末端細胞外ドメイン」、例えばヒト93870のN末端細胞外ドメイン(例えば配列番号2の残基1~27)に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%相同な領域を有する。N末端細胞外ドメインは、細胞外シグナル、例えばリガンドまたは細胞表面受容体と相互に作用できること(例えば結合できること)が好ましい。N末端細胞外ドメインは、タンパク質とタンパク質の相互作用、シグナル伝達、および/または細胞接着を仲介することがより好ましい。 20

【0027】

別の実施形態で、93870タンパク質は、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、または好ましくは7つの膜貫通ドメインを含む。本明細書で使用する「膜貫通ドメイン」という用語は、原形質膜に広がる長さ約15のアミノ酸残基のアミノ酸配列を含む。膜貫通ドメインは、少なくとも約20、23、24、25、30、または35のアミノ酸残基を含んで原形質膜に広がることにより好ましい。膜貫通ドメインは疎水性残基に富み、一般にらせん構造を有する。好ましい実施形態では、膜貫通ドメインのアミノ酸の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上が疎水性であり、例えばロイシンやイソロイシン、チロシン、トリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えば <http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/getdesc?name=7tm-1> や [Zagotta W.N. 他\(1996\) Annual Rev. Neurosci. 19:235~63](http://zagotta.wustl.edu) に記載されており、その内容を参照により本明細書に援用する。ヒト93870は、配列番号2のアミノ酸28(細胞外末端)あたりからアミノ酸51(細胞質末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸58(細胞質末端)あたりからアミノ酸79(細胞外末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸98(細胞外末端)あたりからアミノ酸119(細胞質末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸140(細胞質末端)あたりからアミノ酸160(細胞外末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸192(細胞外末端)あたりからアミノ酸216(細胞質末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸236(細胞質末端)あたりからアミノ酸252(細胞外末端)あたり; 配列番号2のアミノ酸276(細胞外末端)あたりからアミノ酸299(細胞質末端)あたりに延在する7つの膜貫通ドメインも有する。 30 40

【0028】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つの膜貫通ドメインを有し、または少なくとも15、20、23、24、25、30、または35のアミノ酸残基を含む領域であって「膜貫通ドメイン」、例えばヒト93870の少なくとも1つの膜貫通ドメイン(例えば配列番号2の残基28~51、58~79、98~119、140~160、192~216、236~252、および276~299)に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%相同な領域を有する。膜貫通ドメインは、シグナルの伝達、例えば細胞膜を横断する細胞 50

外シグナルの伝達に關与し、かつ/またはシグナル伝達経路を活性化することが好ましい。

【0029】

別の実施形態で、93870タンパク質は、少なくとも1つの細胞外ループを含む。本明細書で使用する「ループ」という用語は、少なくとも約4のアミノ酸残基、好ましくは約5~10、より好ましくは約10~20、さらに好ましくは約20~30のアミノ酸残基の長さを有するアミノ酸配列であって、タンパク質またはポリペプチド内の2つの膜貫通ドメインを接続するものを含む。したがってループのN末端アミノ酸は、天然の93870または93870様分子内の膜貫通ドメインのC末端アミノ酸に隣接し、ループのC末端アミノ酸は、天然の93870または93870様分子内の膜貫通ドメインのN末端アミノ酸に隣接する。本明細書で使用する「細胞外ループ」は、細胞の外側、すなわち細胞外に位置するアミノ酸配列を含む。例えば細胞外ループは、配列番号2のアミノ酸80~97、161~191、および253~275あたりに見ることができる。

10

【0030】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つの細胞外ループを有し、または少なくとも約4のアミノ酸残基、好ましくは約5~10、より好ましくは約10~20、より好ましくは約20~30、最も好ましくは約30~40のアミノ酸残基を有する領域であって「細胞外ループ」、例えばヒト93870の少なくとも1つの細胞外ループ(例えば配列番号2の残基80~97、161~191、および253~275)に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%相同な領域を有する。

20

【0031】

別の実施形態で、93870タンパク質は、本明細書では細胞質ドメインとも呼ばれる少なくとも1つの細胞質ループを含む。本明細書で使用する「細胞質ループ」は、細胞内または細胞の細胞形質内に位置する少なくとも約4のアミノ酸残基、好ましくは約5~10、より好ましくは約10~20、より好ましくは約20~30、最も好ましくは約30~40のアミノ酸残基の長さを有するアミノ酸配列を含む。例えば細胞質ループは、配列番号2のアミノ酸52~57、120~139、および217~235あたりに見られる。

【0032】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも1つの細胞質ループを有し、または少なくとも約4のアミノ酸残基、好ましくは約5~10、より好ましくは約10~20、より好ましくは約20~30、最も好ましくは約30~40のアミノ酸残基を含む領域であって「細胞質ループ」、例えばヒト93870の少なくとも1つの細胞質ループ(例えば配列番号2の残基52~57、120~139、および217~235)に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%相同な領域を有する。細胞質ループ内で、ヒト93870ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸121~122あたりにアルギニン、チロシン(芳香族)ダブレットもそれぞれ有し、これはほとんどのGタンパク質結合膜貫通型受容体の第2の細胞質ループのN末端先端に存在する保存アルギニン芳香族ダブレットに一致するものである。保存ダブレットは、Gタンパク質との相互作用に關与する。

30

40

【0033】

別の実施形態で、93870タンパク質は、本明細書ではC末端細胞質尾部とも呼ばれる「C末端細胞質ドメイン」をタンパク質の配列に含む。本明細書で使用する「C末端細胞質ドメイン」は、少なくとも約5のアミノ酸残基、好ましくは約10~50のアミノ酸残基の長さを有するアミノ酸配列を含み、細胞内または細胞の細胞形質内に位置する。したがって「C末端細胞質ドメイン」のN末端アミノ酸残基は、自然発生する93870または93870様タンパク質中の膜貫通ドメインのC末端アミノ酸残基に隣接する。例えばC末端細胞質ドメインは、配列番号2のアミノ酸残基300~313あたりに見られる。

【0034】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドまたはタンパク質は、C末端細胞質ドメイ

50

ンを有し、または少なくとも約5のアミノ酸残基、好ましくは約10~50のアミノ酸残基を含む領域であって「C末端細胞質ドメイン」、例えばヒト93870のC末端細胞質ドメイン(例えば配列番号2の残基300~313)に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%相同な領域を有する。

【0035】

構造上の類似性に基づき、GPCRファミリーのメンバーを様々なサブファミリーに分類した：すなわちロドプシンおよび2アドレナリン受容体に代表される受容体を含みかつ現在のところ200を超える独自のメンバーを含有するサブファミリーI(Dohlman他(1991)Annu.Rev.Biochem.60:653~688により概説される)；副甲状腺ホルモン/カルシトニン/セクレチン受容体ファミリーを含むサブファミリーII(Juppner他(1991)Science254:1024~1026；Lin他(1991)Science254:1022~1024)；GABA受容体など哺乳動物の向代謝性グルタミン受容体ファミリーを含むサブファミリーIII(Nakanishi他(1992)Science258:597~603)；D.discoidiumの走化性および発生を仲介することが知られているcAMP受容体ファミリーを含むサブファミリーIV(Klein他(1998)Science241:1467~1472)；およびSTE2などの真菌性接合フェロモン受容体を含むサブファミリーV(Kurjan I他(1992)Annu.Rev.Biochem.61:1097~1129により概説される)である。各ファミリー内で、明らかに異なる高度に保存されたモチーフが識別された。これらのモチーフは、受容体の構造的な完全性ならびにGタンパク質との結合に極めて重要であることを示していた。

【0036】

これらGPCRサブファミリーIタンパク質のほとんどの保存部分は、膜貫通領域であり最初の2つの細胞質ループである。保存アルギニン芳香族ダブルットは、第2の細胞質ループのN末端先端に存在し、Gタンパク質との相互作用に関与する。

【0037】

ヒト93870ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基56~123あたりに位置する、ProDom PD000009から得られた受容体結合Gタンパク質受容体膜貫通ドメインも含む(2000.1リリース；<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomI>)。93870タンパク質配列における「受容体結合Gタンパク質膜貫通」ドメインの存在を確認して、問題のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロフィールを有するかどうかの決定を行うには、タンパク質のアミノ酸配列を、1308ファミリー・メンバーのデータベースに対して突き合わせればよい(BLASTP2.0a19MP-WashU(1998年2月5日)を使用して)。スコアの高いセグメント対を含有する配列はProDomから報告される。本明細書で使用する「受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメイン」という用語は、長さが約25~125のアミノ酸残基、好ましくは約50~100アミノ酸、より好ましくは約60~80アミノ酸、または約67アミノ酸のアミノ酸配列を含み、配列と、受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインとのアライメントに関するビット・スコアは少なくとも約50であり、好ましくは約100、より好ましくは約125またはそれ以上であり、E値は約 $3.7e^{-6}$ 以下であり、より好ましくは約 $3.7e^{-7}$ 以下、最も好ましくは約3.7-8以下である。

【0038】

93870タンパク質配列をさらにGタンパク質共役型受容体と特定するために、ドメインのデータベース、例えばProDomデータベースに対してタンパク質のアミノ酸配列を検索した(Corpet他(1999)Nucl.Acids Res.27:263~267)。ProDomタンパク質ドメイン・データベースは、相同なドメインの自動コンパイルからなる。ProDomの現行バージョンは、SWISS-PROT38およびTREMBLタンパク質データベースの帰納的PSI-BLASTサーチ(Altschul他(1997)Nucleic Acids Res.25:3389~3402

; Gouzy 他 (1999) Computers and Chemistry 23 : 333 ~ 340) を使用して構築される。データベースは、各ドメインごとにコンセンサス配列を自動的に生成する。BLASTサーチはHMMデータベースに対して行い、ProDom PD000009 (2000.1リリース; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>) からGPCRに関するコンセンサスアミノ酸配列が得られた。PD000009からのコンセンサスアミノ酸配列は、マウスGPCRのアミノ酸56~123、SWISS-PROT: P51676 (配列番号5) である。93870タンパク質配列をGPCRとしてさらに特定するため、ProDom PD000009 (2000.1リリース; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>) から得られたGPCRに関する完全マウスアミノ酸配列を配列番号4として示し、これは、SWISS-PROT: P51676のアミノ酸1~356を表す。93870タンパク質とSWISS-PROT: P51676 (配列番号5) とのアライメントは、2つの配列の間に約21%の配列同一性があることを実証している (blosum62.iij matrixからのmatblasで計算)。

【0039】

受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインには、ProDom 受託番号PD000009 (2000.1リリース; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>) が割り当てられた。ProDomにより予測された93870内の受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインは、そのビット・スコアが141であり、E値が $3.7e-9$ である。マウスアミノ酸配列に対する、ヒト93870の受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメイン (配列番号2のアミノ酸56~123) の上位スコア・アライメントを、(配列番号5) として示す。

【0040】

受容体結合Gタンパク質ドメインは、一般に、下記のコンセンサス配列を有する。

【0041】

[GSTALIVMFYWC] - [GSTANCPDE - {EDPKRH} - x(2) - [LIVMNQGA] - x(2) - [LIVMFT] - [GSTANC] - [LIVMFYSTAC] - [DENH] - R - [FYWC SH] - x(2) - [LIVM] (配列番号6)

このコンセンサス配列は、配列番号2のアミノ酸残基109~125に位置する。このコンセンサス配列パターンでは、パターン中の各要素がダッシュ(-)により分離され; 角括弧[]は、その位置で受け入れられる特定の残基を示し; xは、その位置で任意の残基が受け入れられることを示し; xに続く括弧内の整数は、特定の要素の任意のアミノ酸反復が、その指定された数の残基、すなわちx(2)に対して受け入れられるものであることを示し; { }括弧は、その位置での特定のアミノ酸が、その括弧内に示されるもの以外のいずれかでよいことを示す。

【0042】

本発明の93870ポリペプチドは、PROSITEパターンPD0C00210 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicedoc.pl?PD0C00210>) に示される受容体結合Gタンパク質受容体コンセンサス・パターンの76%に相当する受容体結合Gタンパク質ドメインの一部を含有する。93870ポリペプチドの受容体結合Gタンパク質コンセンサス・パターンは、配列番号2のアミノ酸残基114、118、120、および125で異なり、配列番号2のアミノ酸残基114では「LIVMNQGA」残基のいずれかの代わりに「Y」を用い、配列番号2のアミノ酸残基118では「GSTANC」残基のいずれかの代わりに「L」を用い、配列番号2のアミノ酸残基120では「DENH」残基のいずれかの代わりに「T」を用い、配列番号2のアミノ酸残基125では「LIVM」残基のいずれかの代わりに「F」を用いる。

【0043】

ヒト93870タンパク質は、配列番号2のアミノ酸酸基13～16および17～20あたりに2つのN-グリコシル化部位(Prositateパターン番号PS00001)を有し、配列番号2のアミノ酸残基14～16および267～269あたりに2つのタンパク質キナーゼCリン酸化部位(Prositateパターン番号PS00005)を有し、配列番号2のアミノ酸残基18～21、225～228、および284～287あたりには3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位(Prositateパターン番号PS00006)が位置し、配列番号2のアミノ酸残基176～178あたりには1つのチロシンキナーゼリン酸化部位(Prositateパターン番号PS00007)が位置し、配列番号2のアミノ酸残基38～43、92～97、および305～310あたりには3つのN-ミリスチル化部位(Prositateパターン番号PS00008)が位置する。

10

【0044】

Pfam識別子、PSプレフィックス、およびPFプレフィックス・ドメイン識別番号に関する一般的情報は、Sonhammer他(1997)Protein 28:405～420および<http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>で見ることができる。

【0045】

したがって本発明の一実施形態で、93870は、少なくとも1つ、2つ、または3つ、好ましくは4つ、5つ、または6つ、最も好ましくは7つの膜貫通ドメイン、および/または少なくとも1つ、2つ、好ましくは3つの細胞質ループ、および/または少なくとも1つ、2つ、または好ましくは3つの細胞外ループを含む。別の実施形態で、93870はさらに、N末端細胞外ドメインおよび/またはC末端細胞質ドメインを含む。別の実施形態で、93870は、7つの膜貫通ドメイン、3つの細胞質ループ、3つの細胞外ループを含むことができ、さらにN末端細胞外ドメインおよび/またはC末端細胞質ドメインを含むことができる。

20

【0046】

本発明の93870分子はさらに、少なくとも1つのNグリコシル化部位を含むことができる。93870分子は、1つ、好ましくは2つのタンパク質キナーゼCリン酸化部位を有することができる。93870分子は、少なくとも1つ、2つ、好ましくは3つのカゼインキナーゼIIリン酸化部位を含むことができる。93870分子は、少なくとも1つのチロシンキナーゼリン酸化部位を有することができる。93870分子はさらに、少なくとも1つ、2つ、好ましくは3つのNミリスチル化部位を含むことができる。

30

【0047】

本発明の93870ポリペプチドは93870活性を変化させるので、以下に述べるように、93870で仲介されまたはそれに関連する障害に対する新規な診断薬および治療薬の開発に有用と考えられる。

【0048】

本明細書で使用する「93870活性」、「93870の生物活性」、または「93870の機能的活性」は、生体内外で明らかにされたように、93870タンパク質、ポリペプチド、または核酸分子によって、例えば93870応答細胞や93870基質、例えばタンパク質基質に生じた活性を指す。一実施形態で、93870活性は、93870標的分子に関連付けられたものなどの直接活性である。「標的分子」または「結合パートナー」は、自然状態で93870タンパク質が結合しまたは93870タンパク質と相互に作用する分子である。例示的な実施形態では、93870リガンドがある。93870活性は間接活性でもあり、例えば93870タンパク質と93870リガンドとの相互作用によって仲介される細胞シグナル伝達活性である。

40

【0049】

上述の配列の類似性に基づき、本発明の93870分子は、Gタンパク質共役型受容体サブファミリーIのメンバーと同様の生物活性を有することが予測される。例えば本発明の93870タンパク質は、以下の活性、すなわち(1)細胞外シグナルを調節し、感知し

50

、かつ/または例えば骨芽細胞や好中球、巨核球、骨髄単核細胞などの細胞に伝達する能力と、(2)細胞外シグナルまたは細胞表面受容体と相互に作用する(例えば結合する)能力と、(3)シグナル伝達経路に寄与する細胞内分子を移動させる能力(例えばアデニル酸シクラーゼやホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート(PIP_2)、イノシトール1,4,5-トリホスフェート(IP_3))と、(5)分子の生成または分泌を制御する能力と、(6)細胞成分の構造を変化させる能力と、(7)DNAの合成など、細胞増殖をモジュレートする能力と、(8)例えばそこに発現する細胞や組織など(例えば骨髄単核細胞(例えば顆粒球(例えば好中球)や骨芽細胞、巨核球))の細胞増殖、移行、分化、生存、および/または機能をモジュレートする能力と、(9)骨芽細胞によって骨基質(I型コラーゲン、プロテオグリカン、糖タンパク質)の有機成分の合成をモジュレートする能力と、(10)環境刺激(例えば小分子、タンパク質リガンド)に対する細胞応答を感知し仲介する能力と、(11)生物学的メッセンジャー(例えば分泌ホルモン)に対する細胞応答を感知し仲介する能力と、(12)Gタンパク質にシグナル伝達する能力の、1つまたは複数を有する。このため93870分子は、GPCRに関連する障害を制御するための新規な診断標的および治療薬として働くことができる。

10

20

30

40

50

【0050】

93870受容体タンパク質によって仲介された応答は、その応答が現れる細胞のタイプによって異なる。例えば一部の細胞では、受容体タンパク質に対するリガンドの結合が、例えばホスファチジルイノシトールやサイクリックAMPの物質代謝および代謝回転によって、化合物の放出やチャンネルのゲーティング、細胞接着、移行、分化などの活性を刺激し、一方その他の細胞では、リガンドの結合によって異なる結果をもたらす。受容体タンパク質によってモジュレートされた細胞活性/応答とは関係なく、タンパク質はGPCRでありGタンパク質と相互に作用して、細胞内の様々な細胞内シグナル伝達経路で例えばホスファチジルイノシトールやサイクリックAMPの物質代謝および代謝回転を介して1つまたは複数の2次シグナルを生成することが、広く一般的である。本明細書で使用する「シグナル伝達経路」は、リガンドとGPCR(93870タンパク質)との結合による細胞機能/活性のモジュレーション(例えば刺激や阻害)を指す。そのような機能の例には、例えばホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート(PIP_2)やイノシトール1,4,5-トリホスフェート(IP_3)、アデニル酸シクラーゼなど、シグナル伝達経路に寄与する細胞内分子の移動が含まれる。

【0051】

本明細書で使用する「ホスファチジルイノシトール代謝回転および物質代謝」は、ホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート(PIP_2)の代謝回転および物質代謝に関与する分子、ならびにこれらの分子の活性を指す。 PIP_2 は、原形質膜の細胞質ゾルリーフレットに見られるリン脂質である。リガンドと受容体との結合により、一部の細胞では、原形質膜酵素ホスホリパーゼCが活性化され、 PIP_2 を加水分解して1,2-ジアシルグリセロール(DAG)およびイノシトール1,4,5-トリホスファターゼ(IP_3)を生成することができる。形成されると、 IP_3 は小胞体表面に拡散することができ、 IP_3 受容体、例えば IP_3 結合部位を含むカルシウムチャンネルタンパク質に結合することができる。 IP_3 結合によりチャンネルが開放され、カルシウムイオンは細胞質内に放出される。 IP_3 は、特異的なキナーゼによりリン酸化して、イノシトール1,3,4,5-テトラホスフェート(IP_4)を形成することもできるが、これは細胞外媒体から細胞質内にカルシウムを入れることができる分子である。 IP_3 および IP_4 をその後非常に素早く加水分解して、それぞれ不活性な生成物であるイノシトール1,4-ビスホスフェート(IP_2)およびイノシトール1,3,4-トリホスフェートにすることができる。これら不活性な生成物は、細胞によって再生され、 PIP_2 の合成に使用することができる。 PIP_2 の加水分解によって生成されたその他の第2のメッセンジャー、すなわち1,2-ジアシルグリセロール(DAG)は、細胞膜内に残ったままであり、酵素タンパク質キナーゼCの活性化に役立てることができる。タンパク質キナーゼCは、通常細胞の細胞質に可溶であることがわかっているが、細胞内カルシウム濃度が高くなると、この酵素が原形質膜に移動

して、DAGにより活性化される。種々の細胞でのタンパク質キナーゼCの活性化は、グリコーゲンシンターゼのリン酸化や様々な転写因子、例えばNF- κ Bのリン酸化などの、様々な細胞応答をもたらす。本明細書で使用する「ホスファチジルイノシトール活性」という用語は、PIP₂またはその代謝産物の1つの活性を指す。

【0052】

受容体が寄与する可能性がある別のシグナル伝達経路は、cAMP代謝回転経路である。本明細書で使用する「サイクリックAMP代謝回転および物質代謝」は、サイクリックAMP(cAMP)の代謝回転および物質代謝に関与する分子、ならびにこれら分子の活性を指す。サイクリックAMPは、あるGタンパク質共役型受容体のリガンド誘発性の刺激に応答して生成される、第2のメッセンジャーである。cAMPシグナル伝達経路では、リガンドとGPCRとの結合によって酵素アデニルシクラーゼを活性化させることができ、これがcAMPの合成を触媒する。新たに合成されたcAMPは、cAMP依存性のタンパク質キナーゼを活性化することができる。この活性化キナーゼは、電圧ゲート型のカリウムチャンネルタンパク質または関連するタンパク質をリン酸化することができ、活動電位の間カリウムチャンネルの開放を不可能にする。カリウムチャンネルの開放が不可能になると、通常はニューロンの膜を再分極するカリウムの流出が減少し、膜の脱分極が長くなる。

10

【0053】

93870分子およびそのモジュレーターは、本明細書で述べたGPCRに関連する障害、例えば免疫および炎症性の障害や、血小板障害、骨格または骨の代謝障害、骨髄単核細胞障害の1つまたは複数を制御するための、新規な治療薬として働くことができる。

20

【0054】

GPCR関連の障害には、免疫および炎症性の疾患(例えば、糖尿病や関節炎(リウマチ様関節炎、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎を含む)、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎を含む)、乾癬、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患(例えばクローン病や潰瘍性大腸炎)、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、呼吸器の炎症(例えば喘息やアレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾患)、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい逆反応(leprosy reversal reactions)、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性脳症、特発性両側性進行性感音難聴、再生不良性貧血、真正赤血球性貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーヴェンス-ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、および間質性肺線維症を含む)、移植片対宿主疾患、移植の症例、呼吸器炎症(喘息および慢性閉塞性肺疾患からなる)、およびアトピー性アレルギーなどのアレルギーを含めることができる。GPCR関連の免疫および炎症性障害のその他の例には、先天性のX染色体性小児性低ガンマグロブリン血症、一過性低ガンマグロブリン血症、後天性免疫グロブリン血症、選択的IgA欠損症、慢性皮膚粘膜カンジダ症、または重症複合型免疫不全がある。

30

【0055】

血小板の障害には、例えば化学療法が原因で骨髄中の巨核球数が減少したことに起因する血小板減少;白血病や、特発性あるいは薬物または毒素で誘発された骨髄無形症、希発性の遺伝性無巨核球性血小板減少などの浸潤性障害;無効血小板新生であって、例えば巨大赤芽球性貧血やアルコール毒性、ビタミンB12または葉酸欠損、脊髄形成異常、あるいは希発性の遺伝性障害(例えばウスコット-アルドリッチ症候群やメイ-ヘグリン異常)が原因であるもの;血小板分布の減少であって、例えば硬変や脾臓浸潤性疾患(例えばゴーシェ病)、髄外骨髄様化生による骨髄線維症が原因であるもの;血小板分布の増大であって、例えば単核食細胞系によるIgG被覆血小板の除去が原因であるもの(例えば、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、続発性免疫性血小板減少症(例えば全身性エリテマトーデス、リンパ腫、慢性リンパ球白血病)、薬物関連免疫性血小板減少症(例えばキ

40

50

ニジンやアスピリン、ヘパリンによる)、輸血後紫斑症、および新生児性血小板減少症であって母性血小板自己抗体または母性血小板同種異型抗体によるもの)が含まれるが、これらに限定されない。また、静脈内凝固およびトロンピンにより血小板に誘発された障害に付随する血小板減少症であって、例えば産科合併症、転移性腫瘍、重症グラム陰性菌血症、血栓性の血小板減少性紫斑病、または重症の病気が原因であるものも含まれる。また、例えば大量出血に起因する希釈性血小板減少症も含まれる。血液の血小板障害には、本態性血小板増加症と、例えば脾摘や急性または慢性の炎症性疾患、溶血性貧血、癌腫、ホジキン病、リンパ滲出性障害、悪性リンパ腫に伴う血小板増加症も含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

93870分子異常な発現および/または活性は、骨格の完全性または骨代謝に関連する障害を仲介する可能性がある。「骨格の完全性」は、骨または関節とこれらの構造を接続しその動きを制御する靭帯や腱、筋肉などの組織の形成または維持に対する直接的または間接的な作用を指す。「骨代謝」は、例えば骨形成や骨吸収など、最終的に骨の構造の完全性または血清中のカルシウムおよびリン酸の濃度に影響を及ぼす可能性のある骨構造の形成または退化での、直接的または間接的な作用を指す。この用語は、破骨細胞や骨芽細胞など、骨形成および退化をもたらす骨細胞内の93870分子の作用によって仲介された活性も含む。これらの細胞は、他にも役割はあるが、とりわけ膠原性骨基質の合成およびリモデリングを担っている。リン酸カルシウムに加えてコラーゲンは、骨および骨関連骨格構造の主要な構成成分であり、したがってコラーゲンの合成および処理は骨または骨格構造に欠かせない。93870分子は、骨に適切なコラーゲン基質をもたらすステップの1つまたは複数に関与することができる。別の実施形態で、93870分子は、単球および単核食細胞の破骨細胞への分化に刺激を与えるなど、骨吸収破骨細胞の種々の働きを支えることができる。したがって、骨細胞の生成をモジュレートする93870分子は骨形成および退化に影響を及ぼすことができ、そのため骨格または骨障害の治療に使用することができる。そのような障害の例には、骨形成不全症、骨粗しょう症、骨形成異常症、骨軟化症、くる病、嚢胞性線維性骨炎、エーラース-ダンロス症候群、腎性骨形成異常症、骨硬化症、抗痙攣治療、オステオペニア、骨線維形成不全症、続発性副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能低下症、上皮小体機能亢進症、硬変、閉塞性黄疸、薬物誘発性代謝、髄様癌、慢性腎疾患、くる病、サルコイドーシス、グルココルチコイド拮抗作用、吸収不良症候群、脂肪便、熱帯性スプルー、特発性高カルシウム血症、および乳熱が含まれるが、これらに限定されない。

【0057】

93870タンパク質、その断片、およびその配列番号2の配列の誘導体とその他の変種を、まとめて「本発明のポリペプチドまたはタンパク質」または「93870ポリペプチドまたはタンパク質」と呼ぶ。そのようなポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸分子を、まとめて「本発明の核酸」または「93870核酸」と呼ぶ。

【0058】

本明細書で使用する「核酸分子」という用語は、DNA分子(例えばcDNAやゲノムDNA)およびRNA分子(例えばmRNA)と、例えばヌクレオチド類似体を使用することにより生成されたDNAまたはRNAの類似体を含む。核酸分子は1本鎖または2本鎖でよいが、2本鎖DNAであることが好ましい。

【0059】

「単離しまたは精製した核酸分子」という用語は、核酸の自然源に含まれるその他の核酸分子から分離した核酸分子を含む。例えばゲノムDNAについて、「単離した」という用語は、ゲノムDNAが自然の状態では結合する染色体から分離した核酸分子を含む。「単離した」核酸は、核酸が導き出される生体のゲノムDNA中にある、もともと核酸の両側に配置された配列(すなわち核酸の5'および/または3'末端に位置付けられた配列)を、含まないことが好ましい。例えば様々な実施形態で、単離した核酸分子は、約5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb、または0.1kb未満の5'および/また

10

20

30

40

50

は3'ヌクレオチド配列であって、核酸が導き出される細胞のゲノムDNA中の核酸分子の両側にもともと配置された配列を含有することができる。さらに、cDNA分子などの「単離した」核酸分子は、実質的にその他の細胞物質、または組換え技法によって生成する場合は培地を含まなくてよく、あるいは化学的に合成する場合は、実質的に化学前駆体またはその他の化学物質を含まなくてよい。

【0060】

本明細書で使用する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という文言は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を述べている。ストリンジェントな条件は当業者に知られており、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley & Sons、N.Y. (1989)、6.3.1 ~ 6.3.6に見ることができる。その参考文献には水性および非水性の方法が記載されており、いずれも使用することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の好ましい例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45℃でハイブリダイゼーションを行い、その後0.2×SSC、0.1% SDS中、約50℃で1回または複数回洗浄することである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の別の例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45℃でハイブリダイゼーションを行い、その後0.2×SSC、0.1% SDS中、55℃で1回または複数回洗浄することである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のその他の例は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45℃でハイブリダイゼーションを行い、その後0.2×SSC、0.1% SDS中、60℃で1回または複数回洗浄することである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、約45℃でハイブリダイゼーションを行い、その後0.2×SSC、0.1% SDS中、65℃で1回または複数回洗浄することが好ましい。特に好ましいストリンジェントな条件(および本発明のハイブリダイゼーションの限度内に分子があるかどうかを決定するのにどの条件を適用すべきか実行者が確かではない場合に使用すべき条件)は、0.5 Mリン酸ナトリウム、7% SDS(65℃)の後、0.2×SSC、1% SDS(65℃)で1回または複数回洗浄することである。ストリンジェントな条件下で配列番号1または配列番号3の配列にハイブリダイズする本発明の単離核酸分子は、天然に生ずる核酸分子に相当することが好ましい。

【0061】

本明細書で使用する「天然に生ずる」核酸分子は、自然に生じるヌクレオチド配列を有するRNAまたはDNA分子を指す(例えば天然のタンパク質をコードする)。

【0062】

本明細書で使用する「遺伝子」および「組換え遺伝子」という用語は、93870タンパク質、好ましくは哺乳動物の93870タンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含む核酸分子であって、さらに非コード調節配列、およびイントロンを含むことができる核酸分子を指す。

【0063】

「単離した」または「精製した」ポリペプチドまたはタンパク質は、タンパク質が得られる細胞または組織源からの細胞物質またはその他の汚染タンパク質を実質的に含まず、あるいは化学的に合成する場合は、化学前駆体またはその他の化学物質を実質的に含まない。一実施形態で、「実質的に含まない」という文言は、非93870タンパク質(本明細書では「汚染タンパク質」とも呼ぶ)あるいは化学前駆体または非93870化学物質を、約30%、20%、10%未満、より好ましくは5%未満(乾燥重量で)有する93870タンパク質調製物を意味する。93870タンパク質またはその生物学的に活性なタンパク質を組換え技術により生成する場合は、培地、すなわちタンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満に相当する培地を実質的に含まないことも好ましい。本発明は、単離したまたは精製した調製物を、乾燥重量で少なくとも0.01、0.1、1.0、および10ミリグラム含む。

【0064】

「非必須」アミノ酸残基は、生体活性を止めることなく、より好ましくは生体活性を実質的に変化させることなく、93870野生型配列（例えば配列番号1または3の配列、あるいは受託番号__でATCCに寄託されたプラスミドのDNAインサートのヌクレオチド配列）から変性させることのできる残基であり、一方「必須」アミノ酸残基はそのような変化をもたらすものである。例えば本発明のポリペプチドに沿って維持されるアミノ酸残基、例えば7つの膜貫通受容体ドメイン中に存在するものは、特に容易に変化しにくいと予測される。

【0065】

「保存アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換わるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）酸性側鎖を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えばアラニン、ヴァリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えばトレオニン、ヴァリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。このため、予測される93870タンパク質中の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基に置き換わることが好ましい。あるいは別の実施形態では、飽和突然変異誘発などによって、93870コード配列の全てまたは一部に沿ってランダムに突然変異体を導入することができ、得られた突然変異体を93870生体活性に関しスクリーニングして、活性を保つ突然変異体を同定することができる。配列番号1または配列番号3、あるいは受託番号__でATCCに寄託されたプラスミドのDNAインサートのヌクレオチド配列の突然変異誘発の後、コードされたタンパク質を組換え技術により発現させることができ、タンパク質の活性を決定することができる。

【0066】

本明細書で使用する93870タンパク質の「生体活性部分」は、93870分子と非93870分子との相互作用に寄与する93870タンパク質の断片を含む。93870タンパク質の生体活性部分は、例えば配列番号2で示されるアミノ酸配列など93870タンパク質のアミノ酸配列であって、完全長9870タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み93870タンパク質の少なくとも1つの活性を示す配列に、十分に相同なまたはそこから得られたアミノ酸配列を含んだペプチドを含む。一般に生体活性部分は、93870タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフ、例えば細胞外シグナルを調節し感知しかつ/または例えば造血細胞などの細胞に伝達することができるドメインまたはモチーフ；細胞外シグナルまたは細胞表面受容体と相互に作用することができる（例えば結合することができる）ドメインまたはモチーフ；シグナル伝達経路（例えばアデニル酸シクラーゼやホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート（PIP₂）、イノシトール1,4,5-トリホスフェート（IP₃））に寄与する細胞内分子を移動させることができるドメインまたはモチーフ；原形質膜の極性を調節することができるドメインまたはモチーフ；分子の生成または分泌を制御することができるドメインまたはモチーフ；細胞成分の構造を変化させることができるドメインまたはモチーフ；細胞増殖、例えばDNAの合成をモジュレートすることができるドメインまたはモチーフ；および/または細胞の移行、増殖、および/または分化をモジュレートすることができるドメインまたはモチーフを含む。

【0067】

93870タンパク質の生体活性部分は、例えば長さが10、25、50、100、200またはそれ以上のアミノ酸であるポリペプチドでよい。93870タンパク質の生体活性部分は、93870で仲介される活性、例えば本明細書で述べる生体活性をモジュレートする薬剤を開発するための標的として使用することができる。

10

20

30

40

50

【0068】

配列同士の相同性または配列の同一性（「相同性および同一性」という用語は、本明細書では同義のものとして使用する）の計算は、下記の通りを行う。

【0069】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列の同一性を決定するには、最適な比較をするためにこれらの配列を突き合わせる（例えば、最適なアライメントを行うため、第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較の際には非相同な配列を無視してよい）。好ましい実施形態では、比較のため突き合わせが行われる基準配列の長さは、基準配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも60%、さらに好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である（313アミノ酸残基を有する配列番号2の93870アミノ酸配列に第2の配列を突き合わせる場合、少なくとも94、好ましくは少なくとも125、より好ましくは少なくとも157、さらに好ましくは少なくとも189、さらに好ましくは少なくとも219、250、282、または313のアミノ酸残基を突き合わせる）。次いで対応するアミノ酸の位置またはヌクレオチドの位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列におけるある位置を、それに対応する第2の配列内の位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドが占めている場合、分子はその位置で同一である（本明細書で使用するように、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」に等しい）。2つの配列同士の同一性は、それらの配列によって共有される同一位置の数の関数であって、2つの配列の最適なアライメントを行うために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れたものである。

10

20

【0070】

2つの配列同士の配列比較および同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用することができる。好ましい実施形態で、2つのアミノ酸配列同士の同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）のGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsh（J. Mol. Biol. (48) : 444~453 (1970)）のアルゴリズムを使用して、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックス、ギャップの重み16、14、12、10、8、6、または4と長さの重み1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。別の好ましい実施形態で、2つのヌクレオチド配列同士の同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手可能）のGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMPマトリックスとギャップの重み40、50、60、70、または80および長さの重み1、2、3、4、5、または6を使用して決定する。特に好ましいパラメータの組（本発明の配列の同一性または相同性の限度内に分子があるかどうか決定するのにどのパラメータを適用すべきか実行者が確かではない場合に使用すべきもの）は、ギャップ・ペナルティが12、ギャップ・エクステンド・ペナルティが4、フレームシフト・ギャップ・ペナルティが5のBlossum 62スコアリング・マトリックスである。

30

【0071】

2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列同士の同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた、E. MeyersおよびW. Miller（CABIOS、4 : 11~17 (1989)）のアルゴリズムを使用して、PAM120重み残基テーブル、ギャップ長さペナルティ12、およびギャップ・ペナルティ4を使用して決定することができる。

40

【0072】

本明細書で述べる核酸およびタンパク質配列は、例えばその他のファミリー・メンバーまたは関係する配列を同定するために、公開データベースに対して検索を実行するための「照会配列」として使用することができる。そのような検索は、Altschul他（1990）J. Mol. Biol. 215 : 403~10のNBLASTおよびXBLAST

50

プログラム（バージョン2.0）を使用して実行することができる。BLASTヌクレオチド・サーチは、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12により実行することができ、それによって、本発明の93870核酸分子に相同なヌクレオチド配列が得られる。BLASTタンパク質サーチは、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3により実行することができ、それによって、本発明の93870タンパク質分子に相同なアミノ酸配列が得られる。比較のためギャップ・アライメントを得るには、Altschul他(1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389~3402に記載されているGapped BLASTを使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えばXBLASTやNBLAST）のデフォルト・パラメータを使用することができ、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

10

【0073】

本明細書で使用する「誤発現または異常発現」は、RNAまたはタンパク質レベルでの遺伝子発現の非野生型パターンを指す。これには、非野生型レベルでの発現、すなわち過発現または不足発現；遺伝子が発現する時間または段階が野生型とは異なる発現パターン、例えば所定の発現期間または段階での発現が多いまたは少ないもの（野生型に比べて）；所定の細胞タイプまたは組織タイプでの発現が減少する（野生型に比べて）という点で野生型とは異なる発現のパターン；発現したポリペプチドのスプライシング・サイズ、アミノ酸配列、トランジション後の修飾、または生体活性が、野生型とは異なる発現のパターン；環境刺激または細胞外刺激が遺伝子の発現に及ぼす影響が野生型とは異なる発現のパターン、例えば刺激の強さが大きいまたは小さい状態での発現が増大しまたは減少する（野生型に比べて）パターンが含まれる。

20

【0074】

本明細書で使用する「被験体」は、例えばヒトなどの哺乳動物と、実験または動物または疾病モデルを指すことができる。被験体は、ヒト以外の動物、例えばウマやウシ、ヤギ、またはその他の家畜でもよい。

【0075】

本発明で使用する「精製した細胞調製物」は、植物または動物の細胞の場合、細胞の *in vitro* 調製物を指し、完全に無傷の植物または動物ではない。培養した細胞または微生物細胞の場合は被験細胞が少なくとも10%、より好ましくは50%の調製物からなる。

30

【0076】

本発明の様々な態様を、以下にさらに詳細に述べる。

【0077】

単離核酸分子

一態様で本発明は、本明細書で述べる93870ポリペプチド、例えば完全長93870タンパク質またはその断片、例えば93870タンパク質の生体活性部分をコードする、単離されまたは精製された核酸分子を提供する。また、例えば本発明のポリペプチド、93870 mRNAをコードする核酸分子の同定に使用することも可能なハイブリダイゼーション・プローブとしての使用に適する核酸断片や、例えば核酸分子の増幅または突然変異に用いられるPCRプライマーなど、そのようなプライマーとしての使用に適する断片も含まれる。

40

【0078】

一実施形態で、本発明の単離核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、または寄託されたヌクレオチド配列、またはこれらヌクレオチド配列のいずれかの一部を含む。一実施形態で、核酸分子は、ヒト93870タンパク質をコードする配列（すなわち配列番号1のヌクレオチド147~1085からの「コード領域」）、ならびに5' - 非翻訳配列（配列番号1のヌクレオチド1~146）または3' - 非翻訳配列（配列番号1のヌクレオチド1086~1684）を含む。あるいは核酸分子は、配列番号1のコード領

50

域（例えば配列番号3のヌクレオチド1～939に対応する、配列番号1の147～1085、）のみ、例えば通常は被験配列に付随するランキング配列がないものを含むことができる。別の実施形態で、核酸分子は、配列番号2の313アミノ酸残基タンパク質に対応する配列をコードする。

【0079】

別の実施形態で、本発明の単離核酸分子は、配列番号1、配列番号3、寄託ヌクレオチド配列、またはこれらの配列のいずれかの一部のうち1つに示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。その他の実施形態で、本発明の核酸分子は、配列番号1、配列番号3、および寄託ヌクレオチド配列の1つに示されるヌクレオチド配列に十分に相補的であるので、その配列を有する核酸とハイブリダイズすることができ、それによって安定な2本鎖分子が形成される。

10

【0080】

一実施形態で、本発明の単離核酸分子は、配列番号1、配列番号3、寄託ヌクレオチド配列、およびこれらヌクレオチド配列のいずれかの、好ましくは同じ長さである一部の1つに示されるヌクレオチド配列の全長に対し、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%あるいはそれ以上相同なヌクレオチド配列を含む。

【0081】

93870核酸断片

本発明の核酸分子は、配列番号1および3と寄託ヌクレオチド配列のうち1つの核酸配列の一部のみ含むことができる。例えばそのような核酸分子は、プローブまたはプライマーとして使用できる断片、あるいは93870タンパク質の一部であって例えば93870タンパク質の免疫原性部分または生体活性部分をコードする断片を含むことができる。断片は、ヒト93870の受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインである、配列番号2の残基56～123に対応する断片をコードするヌクレオチドを含むことができる。93870遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の93870ファミリー・メンバーまたはその断片、ならびにその他の種から得た93870相同体またはその断片の同定および/またはクローニングに使用される、プローブおよびプライマーの生成を容易にする。

20

【0082】

別の実施形態で、核酸は、コード領域の一部または全てを含んで5'-または3'-非コード領域のいずれか（または両方）に延びるヌクレオチド配列を含む。その他の実施形態は、本明細書で述べたアミノ酸断片をコードするヌクレオチド配列を含んだ断片を含む。核酸断片は、本明細書で述べる特定のドメインまたは部位あるいはその断片であって、特にその長さが少なくとも約263、265、270、275、280、またはそれ以上のアミノ酸である断片をコードすることができる。断片は、上述の特定のアミノ酸配列またはその断片に対応する核酸配列も含む。核酸断片は、本発明に先駆けて開示されたこれらの断片を包含するものと解釈すべきではない。

30

【0083】

核酸断片は、本明細書で述べるドメイン、領域、または官能部位に対応する配列を含むことができる。核酸断片は、本明細書で述べる1つまたは複数のドメイン、領域、または官能部位も含むことができる。

40

【0084】

93870プローブおよびプライマーが提供される。一般にプローブ/プライマーは、単離されまたは精製されたオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは一般にストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、寄託ヌクレオチド配列、および配列番号1、配列番号3、または寄託ヌクレオチド配列の天然に生ずる対立遺伝子変種または突然変異体のうち1つのセンスまたはアンチセンス配列の、少なくとも約7、12、または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65、または75個の連続したヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオ

50

チド配列の領域を含む。

【0085】

好ましい実施形態で、核酸は、その長さが少なくとも5または10塩基対でありかつ200未満、より好ましくは100未満、または50未満の塩基対のプロープである。本明細書で開示する配列と同一か、あるいは1塩基の差があるか、あるいは5または10塩基よりも少ないものであるべきである。この比較のためアライメントが必要である場合、最大の相同性が得られるようにこれらの配列を突き合わせるべきである。欠失または挿入、または不適性から得られた「ループ」アウト配列は、相違点があるものと考えられる。

【0086】

プロープまたはプライマーは、例えば配列番号2のアミノ酸残基56～123あたりで受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインをコードする核酸のセンス鎖またはアンチセンス鎖から得ることができる。

10

【0087】

別の実施形態では一組のプライマーが提供され、例えば93870配列の選択領域を増幅するのに使用可能なPCRでの使用に適するプライマーが提供される。プライマーは、長さが少なくとも5、10、または50塩基対でありかつ長さが100～200塩基対未満であるべきである。プライマーは、本明細書に開示する配列または天然に生ずる変種と同一かまたは1塩基の差があるべきである。受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメインの下記の領域のいずれかの全てまたは一部を増幅するのに適するプライマーが提供される。例えば、93870ポリペプチドの膜貫通ドメインのいずれか(すなわち配列番号2のアミノ酸残基28～51、58～79、98～119、140～160、192～216、236～252、および276～299)、または配列番号2の93870ポリペプチドの細胞外ドメインのいずれか(すなわちアミノ酸残基80～97、161～191、および253～275)、または配列番号2の93870ポリペプチドの細胞内ドメインのいずれか(すなわちアミノ酸残基52～59、120～139、および217～235)である。

20

【0088】

核酸断片は、本明細書で述べるポリペプチドのエピトープ支持領域をコードすることができる。

【0089】

「93870ポリペプチドの生体活性部分」をコードする核酸断片は、93870生体活性(例えば本明細書で述べる93870タンパク質の生体活性)を有するポリペプチドをコードする、配列番号1、配列番号3、および寄託ヌクレオチド配列のうち1つのヌクレオチド配列の一部を単離し、93870タンパク質のコード部分を発現させ(例えば生体外での組換え発現によって)、93870タンパク質のコード部分の活性を評価することによって、調製できる。例えば、93870の生体活性部分をコードする核酸断片は、受容体結合Gタンパク質膜貫通ドメイン、例えば配列番号2のアミノ酸残基56～123を含むことができる。93870ポリペプチドの生体活性部分をコードする核酸断片は、長さが25以上のヌクレオチドよりも長いヌクレオチド配列を含むことができる。

30

【0090】

一実施形態で、核酸分子は、長さが50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、750、800、850、900、またはそれ以上のヌクレオチドよりも長いヌクレオチド配列であって、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1、配列番号3、および寄託ヌクレオチド配列のうち1つの配列を有する核酸分子とハイブリダイズする配列を含む。

40

【0091】

93870核酸変種

本発明は、配列番号1、配列番号3、および寄託ヌクレオチド配列のうち1つに示されるヌクレオチド配列とは異なる配列を有する核酸分子をさらに包含する。そのような相違は

50

、遺伝暗号の縮重に起因すると考えられる（すなわち、本明細書で開示するヌクレオチド配列によりコードされたものと同じ93870タンパク質をコードする核酸をもたらず相違）。別の実施形態で、本発明の単離核酸分子は、配列番号2とは少なくとも1アミノ酸残基が異なるが、5、10、20、50、または100よりも少ないアミノ酸残基だけ異なるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする。この比較のためアライメントが必要な場合、最大の相同性になるようこれらの配列を突き合わせるべきである。欠失、挿入、または不適正からの「ループ」アウト配列は、相違点があるものと考えられる。

【0092】

本発明の核酸は、特定の発現系に対して好ましくいかまたは好ましくないコドンを含むように選択することができる。例えば核酸は、E. coli、酵母、ヒト、昆虫、またはCHO細胞での発現に対して配列が最適化するように、少なくとも1つのコドン、好ましくはコドンの少なくとも10%または20%が変性したものでよい。

10

【0093】

核酸変種は、対立遺伝子変種（同じ遺伝子座）や相同体（異なる遺伝子座）、定向進化体（異なる生体）などの自然に生ずるものでよく、あるいは自然に生じないものでよい。自然に生じない変種は、ポリヌクレオチド、細胞、または生体に利用できるものも含めた突然変異誘発技法によって作製することができる。変種は、ヌクレオチドの置換、欠失、逆位、および挿入を含むことができる。変種は、コード領域および非コード領域のいずれかまたは両方に生ずることができる。変種は、保存および非保存アミノ酸置換体の両方を生成することができる（コードされた生成物と比べた場合）。

20

【0094】

好ましい実施形態で、核酸は、配列番号1と、配列番号3と、寄託ヌクレオチド配列に対し、例えば下記のように少なくとも1つのヌクレオチド残基が異なるが10、20、30、または40よりも少ないヌクレオチド残基だけ異なる配列、あるいは少なくとも1つのヌクレオチド残基が異なるが被験体である核酸の1%、5%、10%、または20%よりも少ないヌクレオチド残基だけ異なる配列を有する。この分析のため必要なら、最大の相同性が得られるようにこれらの配列を突き合わせるべきである。欠失または挿入、または不適正からの「ループ」アウト配列は相違点があるものと考えられる。

【0095】

定向進化体、相同体、および対立遺伝子変種は、当技術分野で知られている方法を使用して同定することができる。これらの変種は、配列番号1、配列番号3、寄託ヌクレオチド配列、またはこれらの配列のうち1つの断片に示されるヌクレオチド配列に対し、50%、少なくとも約55%、典型的な場合は少なくとも約70~75%、より典型的な場合は少なくとも約80~85%、最も典型的な場合は少なくとも約90~95%、またはそれ以上同一なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。そのような核酸分子は、ストリンジェントな条件下、配列番号1、配列番号3、寄託ヌクレオチド配列、またはこれらの配列の1つの断片のうち1つのヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる。本発明の93870 cDNAの定向進化体、相同体、および対立遺伝子変種に対応する核酸分子は、93870遺伝子と同じ染色体または遺伝子座にマップングすることによって単離することができる。

30

40

【0096】

好ましい変種は、本明細書で述べる93870生体活性のいずれか、例えばGタンパク質共役型受容体を介した化学的またはタンパク質シグナルの変換などと相関関係のあるものを含む。

【0097】

93870（例えばヒト93870）の対立遺伝子変種は、機能的および非機能的タンパク質の両方を含む。機能的対立遺伝子変種は、本明細書で述べる93870生体活性のいずれかを仲介する能力を維持する、個体群内の93870タンパク質の自然に生ずるアミノ酸配列変種である。

【0098】

50

機能的対立遺伝子変種は、典型的な場合、配列番号2の1つまたは複数のアミノ酸の保存置換体のみ、またはタンパク質の非クリティカル領域にある非クリティカル残基の置換、欠失、挿入を含むことになる。非機能的対立遺伝子変種は、本明細書で述べる93870生体活性のいずれかを仲介する能力を持たない、個体群内の93870(例えばヒト93870)タンパク質の自然に生ずるアミノ酸配列変種である。非機能的対立遺伝子変種は、典型的な場合、配列番号2のアミノ酸の非保存的置換、欠失、または挿入、または早期切断、あるいはタンパク質のクリティカルな残基またはクリティカルな領域での置換、挿入、欠失を含むことになる。

【0099】

さらに、その他の93870ファミリー・メンバーをコードする核酸分子、したがって配列番号1、配列番号3、および寄託ヌクレオチド配列のうち1つの93870配列とは異なるヌクレオチド配列を有するものが、本発明の範囲に含まれる。 10

【0100】

アンチセンス核酸分子、リボザイム、および変性93870核酸分子別の態様で、本発明は、93870のアンチセンスである単離核酸分子を特徴とする。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的なヌクレオチド配列であって、例えば2本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的なもの、またはmRNA配列に相補的なものを含むことができる。アンチセンス核酸は、93870コード鎖全体に相補的によく、またはその一部(例えば配列番号3に対応するヒト93870のコード領域)にのみ相補的でよい。別の実施形態で、アンチセンス核酸分子は、93870をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」(例えば5'-および3'-非翻訳領域)のアンチセンスである。 20

【0101】

アンチセンス核酸は、93870mRNAの全コード領域に相補的になるよう設計することができるが、93870mRNAのコードまたは非コード領域の一部のみに対するアンチセンスであるオリゴヌクレオチドがより好ましい。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば問題となっている標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10領域と+10領域の間である、93870mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的でよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが例えば約7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、または80ヌクレオチド残基、あるいはそれ以上でよい。 30

【0102】

本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で知られている手順を使用した化学合成および酵素連結反応を使用して構成することができる。例えばアンチセンス核酸(例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、自然に生ずるヌクレオチドを使用して、あるいは分子の生物学的安定性が増すようにまたはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された2本鎖構造の物理的安定性が増すように設計された様々に修正を加えたヌクレオチドを使用して、化学的に合成することができる。例えばホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向になるようサブクロニグされる発現ベクターを使用して、生物学的に生成することもできる(すなわち挿入された核酸から転写されたRNAは、下記のサブセクションでさらに述べるように、問題となる標的核酸に対してアンチセンス配向になる)。 40

【0103】

本発明のアンチセンス核酸分子は一般に被験体に投与され(例えば、組織部位に直接注射することによって)、または93870タンパク質をコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズしあるいはそこに結合するようにその位置で生成され、それによって、例えば転写および/または翻訳を妨げるなどしてタンパク質の発現を阻害する。あるいは、選択された細胞を目標として全身に投与できるように、アンチセンス核酸分子を変性させることができる。全身投与の場合、例えば細胞表面の受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体にアンチセンス核酸分子を結合させることによって、選 50

択された細胞表面に発現した受容体または抗原に特異的に結合するように、アンチセンス分子を変性させることができる。アンチセンス核酸分子は、本明細書で述べるベクターを使用して細胞に送達することもできる。アンチセンス分子の細胞内濃度を十分なものにするため、強力な $pol\ II$ または $pol\ III$ プロモーターの制御下でアンチセンス核酸分子が配置されるベクター構成が好ましい。

【0104】

さらに別の実施形態では、本発明のアンチセンス核酸分子は アノマー核酸分子である。アノマー核酸分子は、相補的 RNA と特異的な 2 本鎖ハイブリッドを形成するが、これは通常のベータ単位とは対照的に、鎖が互いに平行に通るものである (Gaultier 他 (1987) *Nucl. Acids. Res.* 15: 6625 ~ 6641)。アンチセンス核酸分子は、2'-*o*-メシルリボヌクレオチド (Inoue 他 (1987) *Nucl. Acids. Res.* 15: 6131 ~ 6148) またはキメラ RNA-DNA 類似体 (Inoue 他 (197) *FEB S Lett.* 215: 327 ~ 330) も含むことができる。

10

【0105】

さらに別の実施形態で、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。93870 コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書で開示する 93870 cDNA のヌクレオチド配列 (すなわち配列番号 1 または配列番号 3) に相補的な 1 つまたは複数の配列、および mRNA の切断をもたらす既知の触媒配列 (例えば米国特許第 5,093,246 号または Haselhoff 他 (1998) *Nature* 334: 585 ~ 591 参照) を有する配列を含むことができる。例えば、テトラヒメナ L-19 IVS RNA の誘導体を構成することができ、これは活性部位のヌクレオチド配列が、93870 コード mRNA において切断されるヌクレオチド配列に相補的なものである (例えば米国特許第 4,987,071 号; および米国特許第 5,116,742 号)。あるいは 93870 mRNA を使用して、RNA 分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒 RNA を選択することができる (例えば Bartel 他 (1993) *Science* 261: 1411 ~ 1418)。

20

【0106】

93870 遺伝子発現は、93870 の調節領域 (例えば 93870 プロモーターおよび/またはエンハンサー) に相補的なヌクレオチド配列を標的として、標的細胞内での 93870 遺伝子の転写を妨げる 3 重らせん構造を形成することにより、阻害することができる (Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6: 569 ~ 584; Helene 他 (1992) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27 ~ 36; Maher (1992) *Bioassays* 14: 807 ~ 815)。3 重らせん形成のため標的にすることができる潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を生成することによって増加させることができる。スイッチバック分子は 5' から 3'、3' から 5' へと交互に合成され、したがってまず 2 本鎖構造の一方の鎖、次いで他方の鎖とハイブリダイズするようになり、プリンまたはピリミジンのかなりの大きさのストレッチを 2 本鎖構造の一方の鎖に存在させる必要がなくなる。

30

【0107】

また本発明は、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ分子も提供する。典型的な場合、そのような標識は、化学発光、蛍光、放射性、または比色性のものである。

40

【0108】

93870 核酸分子は、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格を変性させて、例えば安定性やハイブリダイゼーション、分子の可溶性を改善することができる。例えば、核酸分子のリン酸デオキシリボースの主鎖を変性させて、ペプチド核酸を生成することができる (Hyrup 他 (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4: 5 ~ 23)。本明細書で使用する用語「ペプチド核酸」(PNA) は、核酸の模擬体、例えば DNA 模擬体を指し、これはリン酸デオキシリボースの主鎖が擬性ペプチド主鎖に置き換わり、4 つの天然

50

の核酸塩基が維持されるものである。PNAの中性主鎖は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAに特異的なハイブリダイゼーションを可能にする。PNAオリゴマーの合成は、前掲のHyrup他(1996); Perry-O'Keefe他Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670~14675に記載されている標準の固相ペプチド合成プロトコルを使用することができる。

【0109】

93870核酸分子のPNAは、治療および診断の応用分野で使用することができる。例えばPNAは、例えば転写や翻訳の停止を誘発することによって、または複製を妨げることによって、配列に特異的な遺伝子発現モジュレーションを行うためのアンチセンスまたはアンチ遺伝子物質として使用することができる。93870核酸分子のPNAは、遺伝子内の単一塩基対突然変異の分析(例えばPNAに支配されるPCRクランプ)で;その他の酵素と組み合わせて使用する場合には「人工制限酵素」として(例えば前掲のHyrup他(1996)に記載されているSIヌクレアーゼ);あるいはDNA配列決定またはハイブリダイゼーション用のプローブまたはプライマーとして(前掲のHyrup他(1996);前掲のPerry-O'Keefe)使用することもできる。

10

【0110】

その他の実施形態で、オリゴヌクレオチドは、ペプチドなどその他の付属の基(例えば生体内で宿主細胞受容体を標的とするため)、あるいは細胞膜(例えばLetsinger他(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553~6556、Lemaître他(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 684~652;PCT公開番号WO88/09810)または血液脳関門(例えばPCT公開番号WO89/10134参照)を通した輸送を容易にする物質を含むことができる。さらにオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションで誘発される切断物質(例えばKrol他(1998)Bio-Techniques 6: 958~976)またはインターカレーションを起こす物質(例えばZon、1998、Pharm. Res. 5: 539~549)で変性させることができる。このため、オリゴヌクレオチドは別の分子(例えばペプチド、ハイブリダイゼーション誘発型架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発型切断剤)に接合することができる。

20

【0111】

また本発明は、本発明の93870核酸に相補的な少なくとも1つの領域を有する分子ビーコンオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブ分子も含み、2つの相補的な領域の場合は、サンプルに含まれる本発明の93870核酸を定量するのに分子ビーコンが役立つように、一方が蛍光団を有し他方が消光剤を有するものである。分子ビーコン核酸は、例えば米国特許第5,854,033号、米国特許第5,866,336号、および米国特許第5,876,930号に記載されている。

30

【0112】

単離93870ポリペプチド

別の態様で、本発明は、抗93870抗体を増やしまたは試験する(より一般的には結合させる)ための免疫原または抗原として使用される、単離93870タンパク質、または断片、例えば生体活性部分の特徴とする。93870タンパク質は、標準的なタンパク質精製技法を使用して、細胞または組織源から単離することができる。93870タンパク質またはその断片は、組換えDNA技法によって生成することができ、または化学的に合成することができる。

40

【0113】

本発明のポリペプチドは、同義遺伝子、代替転写事象、代替RNAスプライシング事象、代替翻訳および翻訳後事象の存在の結果生ずるものを含む。ポリペプチドは、天然の細胞内でポリペプチドが発現する場合に存在するのと実質的に同じ翻訳後修飾をもたらす系内、例えば培養細胞内で発現することができ、または天然の細胞内で発現する場合に存在する翻訳後修飾の変化または省略、例えばグリコシル化や切断をもたらす系内で発現することができる。

50

【0114】

好ましい実施形態で、93870ポリペプチドは、当技術分野（例えば前掲のStrader他およびそこに引用されている参考文献）で述べる下記の特徴の1つまたは複数をも有する。93870ポリペプチドの好ましい実施形態は、下記の特徴の1つまたは複数をも有する。すなわち、

細胞外シグナルを調節し、感知し、かつ/または細胞内に伝達する能力を有し、
細胞外シグナルまたは細胞表面受容体と相互に作用する（例えば結合する）能力を有し、
シグナル伝達経路に寄与する細胞内分子を移動させる能力を有し（例えばアデニル酸シクラーゼやホスファチジルイノシトール4,5-ビスホスフェート（PIP₂）、イノシトール1,4,5-トリホスフェート（IP₃））、

10

細胞の増殖、移行、分化、および/または生存をモジュレートする能力を有し、
その内部に発現する組織の細胞、例えば骨髄単核細胞や好中球、骨芽細胞、巨核球の機能、
生存、モルホロジー、増殖、および/または分化をモジュレートする能力を有し、
配列番号2の93870タンパク質の分子量、アミノ酸組成、またはその他の物理特性を有し、

全配列の類似性（同一性）が、配列番号2のポリペプチドの少なくとも60～65%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75、80、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%、またはそれ以上であり、

好ましくは配列番号2のアミノ酸残基1～27に対して約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一であるN末端細胞外ドメインを有し、

20

配列番号2のアミノ酸残基28～51、58～79、98～119、140～160、192～216、236～252、276～299に対して好ましくは約70%、80%、90%、95%、またはそれ以上が同一である少なくとも1つの膜貫通ドメインを有し、
配列番号2のアミノ酸残基300～313に対して好ましくは約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が同一であるC末端ドメインを有し、または

配列番号2のアミノ酸残基121～122あたりに存在するアルギニン芳香族モチーフに同一なモチーフを有する。

30

【0115】

好ましい実施形態で、93870タンパク質またはその断片は、配列番号2内の対応する配列に対し、あったとしてもわずかしが異なる。一実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸残基が異なるが15、10、または好ましくは5よりも少ないアミノ酸残基が異なる。別の実施形態では、配列番号2内の対応配列に対して少なくとも1残基異なるが、残基の20%、15%、10%、または5%より少ない分が、配列番号2内の対応配列とは異なる（この比較でアライメントが必要な場合。最大の相同性になるようこれらの配列を突き合わせるべきである）。欠失、挿入、または不適正からの「ループ」アウト配列は相違点があるものと考えられる。相違点は、好ましくは非必須アミノ酸残基での差または変更であり、あるいは1つの残基から次の残基への保存的置換に関与する。好ましい実施形態で、相違点は、93870タンパク質N末端の膜貫通ドメイン、細胞外ドメイン、または第2の細胞質ループにはない。

40

【0116】

その他の実施形態は、配列番号2に対し、アミノ酸配列に1つまたは複数の変化を有するタンパク質を含む（例えば活性に必須ではないアミノ酸残基での変化）。そのような93870タンパク質は、アミノ酸配列が配列番号2とはことなるが、それでも生体活性が維持されている。

【0117】

少なくとも下記のヒト組織および細胞系における93870発現のTaqMan分析に基づく下記の発現パターン（以下の具体例で述べる）：正常な骨髄単核細胞、および好中球

50

での高レベルの93870発現、ヒト骨芽細胞、および巨核球での低レベルの93870発現

一実施形態で、タンパク質は、配列番号2に対し、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、またはそれ以上相同なアミノ酸配列を含む。

【0118】

配列番号2に対し、例えば配列番号2の120~139アミノ酸残基に対応する領域の一方または両方が少なくとも1つのアミノ酸残基だけ異なりかつ15、10、または5よりも少ないアミノ酸残基が異なるアミノ酸配列であって、かつ配列番号2に対して93870タンパク質の膜貫通ドメイン、N末端細胞外ドメイン、または第2の細胞質ループに対応する領域が異なるアミノ酸配列を有する93870タンパク質または断片が提供される(この比較でアライメントが必要な場合、最大の相同性が得られるようこれらの配列を突き合わせるべきである。欠失または挿入、または不適正からの「ループ」アウト配列は相違点があるものと考えられる)。いくつかの実施形態で、この相違点は、必須ではない残基にありまたは保存的置換であり、一方その他の実施形態では、この相違点は必須の残基にありまたは非保存的置換である。

10

【0119】

93870タンパク質の好ましい生体活性部分は、下記の事項、すなわちN末端細胞外ドメインと、細胞外ループと、細胞質ループの少なくとも1つまたは複数を含むことができる。さらに、タンパク質のその他の領域が欠失するその他の生体活性部分は、組換え技法によって調製することができ(例えば、定義されたシグナル伝達カスケードを開始する当技術分野で知られているタンパク質の特徴的ドメインを93870タンパク質の細胞内ドメインの代わりに用いてキメラ受容体を生成するため)、天然の93870タンパク質の機能的活性の1つまたは複数进行评估することができる。

20

【0120】

好ましい実施形態で、93870タンパク質は、アミノ酸配列の配列番号2を有する。その他の実施形態で、93870タンパク質は、配列番号2と実質的に同一である。さらに別の実施形態で、93870タンパク質は配列番号2と実質的に同一であり、配列番号2のタンパク質の機能的活性を維持する。

【0121】

93870キメラまたは融合タンパク質別の態様で、本発明は、93870キメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書で使用する93870「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非93870ポリペプチドに結合した93870ポリペプチドを含む。「非93870ポリペプチド」は、93870タンパク質に実質的に相同ではないタンパク質、例えば93870タンパク質とは異なるものであって同じかまたは異なる生体から得られたタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。融合タンパク質の93870ポリペプチドは、93870アミノ酸配列の全てまたは一部、例えば本明細書で述べる断片に対応させることができる。好ましい実施形態で、93870融合タンパク質は、93870タンパク質の少なくとも1つまたは複数の生体活性部分を含む。非93870ポリペプチドは、93870ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に融合することができる。

30

40

【0122】

融合タンパク質は、リガンドに対して親和性の高い部分を含むことができる。例えば融合タンパク質は、93870配列がGST配列のカルボキシル末端に融合するGST-93870融合タンパク質でよい。そのような融合タンパク質は、組換え93870の精製を促進させることができる。あるいは融合タンパク質は、そのアミノ末端に異種シグナル配列を含有する93870タンパク質でよい。ある宿主細胞(例えば哺乳動物宿主細胞)では、異種シグナル配列を使用することによって、93870の発現および/または分泌を増大させることができる。

【0123】

50

融合タンパク質は、血清タンパク質の全てまたは一部、例えば免疫グロブリンの一部（例えばIgG、IgA、またはIgE）、例えば免疫グロブリンまたはヒト結成アルブミンのFc領域および/またはヒンジC1およびC2配列を含むことができる。

【0124】

本発明の93870融合タンパク質は、医薬品組成物に組み込んで、被験者の生体内に投与することができる。93870融合タンパク質を使用して、93870基質の生物学的利用能に影響を及ぼすことができる。例えば(i)93870タンパク質をコードする遺伝子の異常な変性または突然変異、(ii)93870遺伝子の調節ミス、および(iii)93870タンパク質の異常な翻訳修飾によって引き起こされた障害の治療に際し、93870融合タンパク質は治療上有用と考えられる。

10

【0125】

さらに、本発明の93870融合タンパク質を免疫原として使用して、被験体内で抗93870抗体を生成し、93870リガンドを精製し、スクリーニング・アッセイでは93870と93870基質との相互作用を阻害する分子を同定することができる。

【0126】

融合部分を既にコードする発現ベクターが市販されている（例えばGSTペプチド）。93870コード核酸は、融合部分がインフレームで93870タンパク質に結合するように、そのような発現ベクターにクローニングすることができる。

【0127】

93870タンパク質の変種

20

別の態様で、本発明は、例えば作動薬（擬似作用薬）としてまたは拮抗薬として機能する93870ポリペプチドの変種も特徴とする。93870タンパク質の変種は、突然変異誘発、例えば離散点突然変異、配列の挿入または欠失、または93870タンパク質の切断によって生成することができる。93870タンパク質の作動薬は、自然に生ずる形態の93870タンパク質の活性と同様のもの、またはサブセットを十分維持することができる。93870タンパク質の拮抗薬は、例えば93870タンパク質の93870仲介活性を競合的にモジュレートすることによって、天然形態の93870タンパク質の活性の1つまたは複数を阻害することができる。このため、特異的な生物学的作用を、限られた機能を持つ変種で治療することによって引き出すことができる。天然形態のタンパク質の生体活性のサブセットを有する変種を用いた被験体の治療は、天然形態の93870タンパク質による治療に比べて被験体内での副作用が少ないことが好ましい。

30

【0128】

93870タンパク質の変種は、作動薬または拮抗薬の活性に関し、93870タンパク質の突然変異体、例えば切断型突然変異体のコンビナトリアル・ライブラリーをスクリーニングすることによって同定することができる。

【0129】

93870タンパク質コード配列の断片、例えばアミノ末端やカルボキシル末端、内部断片などのライブラリーは、93870タンパク質の変種をスクリーニングしその後選択するための、断片の異型個体群を生成するのに使用することができる。

【0130】

システイン残基が付加しまたは欠失する変種、あるいはグリコシル化する残基が付加しまたは欠失する変種が特に好ましい。

40

【0131】

点突然変異または切断によって作製されたコンビナトリアル・ライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするための、また選択された性質を有する遺伝子産物に関するcDNAライブラリーをスクリーニングするための方法。再帰的アンサンプル突然変異誘発(REM)、すなわちライブラリー内での機能的突然変異体の頻度を高める技法は、93870変種を同定するために、スクリーニング・アッセイと組み合わせて使用することができる(Arkin他(1992)Proc.Natl.Acad.U.S.A.89:7811~7815;Delgrave他(1993)Protein Engng.6:327~33

50

1)。

【0132】

異型93870ライブラリーの分析には細胞ベースのアッセイを活用することができる。例えば発現ベクターのライブラリーを、細胞系、例えば通常は基質に依存するやり方で93870に应答する細胞系に、トランスフェクトすることができる。次いでトランスフェクトされた細胞を93870に接触させ、93870基質によるシグナル伝達に対して突然変異体の発現が及ぼす影響を、例えば細胞増殖および/または酵素活性の変化を測定することによって、検出することができる。次いで93870基質によるシグナル伝達の阻害、あるいは増強作用を認める細胞からプラスミドDNAを回収し、個々のクローンを特徴付けることができる。

10

【0133】

別の態様で、本発明は、例えば天然の93870ポリペプチドの拮抗薬や作動薬、超作動薬など、非野生型活性を有するペプチドなど、93870ポリペプチドを作製する方法を特徴とする。この方法は、93870ポリペプチドの配列を変化させること、すなわち例えば本明細書に開示する非保存領域、ドメイン、または残基のうち1つまたは複数の残基を置換しまたは欠失させることによって配列を変化させること、および変化させたポリペプチドを所望の活性に関して試験することを含む。

【0134】

別の態様で、本発明は、自然に生ずる93870ポリペプチドの生体活性を有する93870ポリペプチドの断片または類似体を作製する方法を特徴とする。この方法は、例えば93870ポリペプチドの1つまたは複数の残基を置換しまたは欠失させることによって配列を変化させること、すなわち例えば本明細書で述べる非保存領域、またはドメイン、または残基の配列を変化させること、および変化させたポリペプチドを所望の活性に関して試験することを含む。

20

【0135】

抗93870抗体

別の態様で、本発明は、抗93870抗体を提供する。本明細書で使用する「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子または免疫学的に活性なその部分、すなわち抗原結合部分を指す。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分は、scFvおよびdcFv断片、F(ab)およびF(ab')₂断片であって、それぞれパインやペプシンなどの酵素で抗体を処理することによって生成できるものを含む。

30

【0136】

抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体でよく、例えばキメラ抗体、人化抗体、完全ヒト抗体、非ヒト抗体、例えばマウス抗体や、あるいは1本鎖抗体でよい。好ましい実施形態で、抗体はエフェクター機能を有し、補体を固定することができる。抗体は、毒素または造影剤に結合することができる。

【0137】

完全長93870タンパク質、または93870の抗原性ペプチド断片は、免疫原として使用することができる。またはその他の免疫原、例えば細胞や膜調製物などで作製された抗93870抗体を同定するのに使用することができる。93870の抗原性ペプチドは、配列番号2に示すアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含むべきであり、93870のエピトープを包含する。抗原性ペプチドは、好ましくは少なくとも10アミノ酸残基を含み、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、さらに好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を含む。

40

【0138】

配列番号2の、本明細書で述べる細胞外ドメインまたは領域あるいは細胞質ドメインまたは領域を含む93870の断片は、抗体を作製するのに使用することができる。あるいは、本明細書に述べる配列番号2の膜貫通ドメインを含む93870の断片を、抗体を作製するのに使用することができる。図1は、その他の抗93870抗体を作製することのできる、疎水性または親水性の領域を示すのに使用することが可能なヒト93870のハイ

50

ドロパシー・プロットを示す。

【0139】

本明細書で述べるこれらの領域あるいはその他の領域またはドメインのいずれかに反応しまたは特異的でありまたは選択的である抗体が提供される。

【0140】

抗原性ペプチドに包含される好ましいエピトープは、タンパク質の表面に位置付けられた93870の領域、例えば親水性領域（図1参照）であると共に、抗原性の高い領域である。例えば、ヒト93870タンパク質配列のEmini表面確率分析を使用して、93870タンパク質の表面に局在化する確率が特に高い領域であって、抗体生成を標的とするのに役立つ表面残基を構成し易い領域を示すことができる。好ましい実施形態では、抗体が、本明細書で述べる93870タンパク質上の任意のドメインまたは領域のエピトープに結合する。

10

【0141】

好ましい実施形態で、抗体は、本明細書で述べる93870タンパク質上の任意のドメインまたは領域のエピトープに結合する。

【0142】

例えばヒトの患者の治療上の処置（およびいくつかの診断適用例）など、反復投与を含む適用分野では、キメラ抗体、人化抗体が好ましいが、しかし最も好ましいのは完全ヒト抗体である。

【0143】

抗93870抗体は、1本鎖抗体でよい。1本鎖抗体（scFV）は、例えばColcher他（1999）Ann. N. Y. Acad. Sci. 880:263~280やReiter（1996）Clin. Cancer Res. 2:245~252に記載されるように、設計製作することができる。同じ標的93870タンパク質の種々のエピトープに特異的な多価抗体を生成するために、1本鎖抗体を2量体化しまたは多量体化することができる。

20

【0144】

好ましい実施形態で、抗体は、Fc受容体に結合する能力が低下しており、またはそのような能力を持っていない。例えば抗体は、Fc受容体への結合を支えないアイソタイプ、サブタイプ、断片、またはその他の突然変異体でよく、例えば、突然変異しまたは欠失したFc受容体結合領域を有することができる。

30

【0145】

抗93870抗体（例えばモノクローナル抗体）は、アフィニティ・クロマトグラフィや免疫沈降などの標準的な技法によって93870を単離するのに使用することができる。さらに、抗93870抗体は、タンパク質の発現の発生量およびパターンを評価するために、93870タンパク質（例えば細胞溶解産物や細胞上澄み内）を検出するのに使用することができる。抗93870抗体は、臨床検査手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニターするために、例えば所定の治療計画の有効性を決定するために、診断上使用することができる。検出は、検出可能な物質（すなわち抗体標識）に抗体を連結する（すなわち物理的に結合する）ことによって促進させることができる。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、ルミネッセント物質、生物ルミネッセント物質、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが含まれ、ルミネッセント物質の例にはルミノールが含まれ、生物ルミネッセント物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、適切な放射性物質の例には¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、または³Hが含まれる。

40

50

【0146】

組換え発現ベクター、宿主細胞、および遺伝子操作された細胞

別の態様で、本発明は、本明細書で述べるポリペプチドをコードする核酸を含有するベクター、好ましくは発現ベクターを含む。本明細書で使用する「ベクター」という用語は、そこに結合してプラスミド、コスミド、またはウイルスベクターを含むことができる、別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を指す。ベクターは、自律的複製が可能であり、または宿主DNAに組み込むことができる。ウイルスベクターには、例えば複製欠陥レトロウイルスやアデノウイルス、アデノ随伴ウイルスが含まれる。

【0147】

ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適する形をした93870核酸を含むことができる。組換え発現ベクターは、発現する核酸配列に作動可能に結合した1つまたは複数の調節配列を含むことが好ましい。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現制御要素（例えばポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列には、ヌクレオチド配列の構成的発現を支配するもの、ならびに組織に特異的な調節および/または誘導配列が含まれる。発現ベクターの設計は、形質変換する宿主細胞の選択や所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に応じて、様々に変えることができる。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入することができ、それによって、本明細書で述べた核酸によりコードした融合タンパク質またはポリペプチドを含めたタンパク質またはポリペプチドが生成される（例えば93870タンパク質、93870タンパク質の突然変異体の形、融合タンパク質など）。

【0148】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞における93870タンパク質の発現に合わせて設計することができる。例えば本発明のポリペプチドは、E. coli、昆虫細胞（例えばバキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞、または哺乳動物細胞で発現することができる。適切な宿主細胞について、Goeddel (1990、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego)でさらに論じられる。あるいは組換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、生体外で、転写し翻訳することができる。

【0149】

原核細胞でのタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を支配する構成的または誘導性プロモーターを含むベクターを用いることにより、E. coliで最もしばしば行われる。融合ベクターは、いくつかのアミノ酸を内部にコードするタンパク質に付加し、通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。そのような融合ベクターは、一般に3つの目的、すなわち1)組換えタンパク質の発現を増大させること、2)組換えタンパク質の溶解度を高めること、および3)アフィニティ精製でのリガンドとして働くことによって組換えタンパク質の精製を助けることを実現する。しばしば、融合部分と組換えタンパク質との接合部にタンパク質分解切断部位が導入され、その結果、融合タンパク質を精製した後に、組換えタンパク質を融合部分から切り離すことが可能になる。このような酵素、およびそれと同源の認識配列は、Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith他(1988) Gene 67:31~40)、pMAL (New England Biolabs、Beverly、MA)、およびpRUT5 (Pharmacia、Piscataway、NJ)であって、それぞれグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはタンパク質Aを標的組換えタンパク質に融合するものを含む。

【0150】

精製した融合タンパク質は、93870活性のアッセイ（例えば、以下に詳細に述べる直接的アッセイまたは競合アッセイ）に使用することができ、または93870タンパク質に特異的な抗体を生成するのに使用することができる。好ましい実施形態で、本発明のレ

10

20

30

40

50

トロウイルス発現ベクターで発現した融合タンパク質は、放射線照射を受けたレシピエントにその後移植される骨髄細胞を感染するのに使用することができる。次いで十分な時間が経過した後（例えば6週間）、被験レシピエントの病態を検査する。

【0151】

E. coliでの組換えタンパク質発現を最大にするため、タンパク質分解によって組換えタンパク質を切断する能力が弱められた宿主菌株内でタンパク質を発現させる（Gottesman、1990、Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185、Academic Press、San Diego、119~128）。別の方策は、各アミノ酸に対する個々のコドンがE. coli内で優先的に利用されるものになるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変化させることである（Wada他（1992）Nucl. Acids Res. 20:2111~2118）。そのような本発明の核酸配列の変更は、標準的なDNA合成技法によって行うことができる。

10

【0152】

93870発現ベクターは、酵母発現ベクターや、例えばバキュロウイルス発現ベクターなど昆虫細胞内で発現させるためのベクター、または哺乳動物細胞での発現に適するベクターでよい。

【0153】

哺乳動物細胞で使用する場合、発現ベクターの制御機能はしばしばウイルス調節要素によって提供される。例えば一般に使用されるウイルスプロモーターは、ポリオーム、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40（SV40）から得られる。

20

【0154】

別の実施形態で、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞タイプにおいて優先的に核酸の発現を支配することができる（例えば核酸を発現させるために、組織に特異的な調節要素を使用する）。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkert他（1987）Genes Dev. 1:268~277）、リンパ球特異的プロモーター（Calame他（1988）Adv. Immunol. 43:235~275）、特にT細胞受容体（Winoto他（1989）EMBO J. 8:729~733）および免疫グロブリン（Banerji他（1983）Cell 33:729~740；Queen他（1983）Cell 33:741~748）のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば神経フィラメントプロモーター；Byrne他（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473~5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlund他（1985）Science 230:912~916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州特許出願公開第264,166号）が含まれる。分化調節性プロモーター、例えばマウスhoxプロモーター（Kessel他（1990）Science 249:374~379）や胎児性タンパク質プロモーター（Campey他（1989）Genes Dev. 3:537~546）も包含される。

30

40

【0155】

本発明はさらに、アンチセンスの向きに発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。アンチセンスの向きにクローニングされた核酸に動作可能に結合された調節配列（例えばウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー）は、様々な細胞タイプで、アンチセンスRNAの構成的で組織特異的なまたは細胞タイプに特異的な発現を支配するものを選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形をとるものでよい。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の考察に関しては、Weintrub, H.他（1986）Trends Genet. 1:Reviewを参照されたい。

50

【0156】

別の態様で、本発明は、本明細書で述べる核酸分子を含んだ宿主細胞を提供し、例えば、組換え発現ベクター内の93870核酸分子や、宿主細胞のゲノムの特定の部位に相同的に組み換えることが可能な配列を含有する93870核酸分子を含んだ宿主細胞を提供する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書では同義のものとして使用する。そのような用語は、特定の被験細胞だけではなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫も指す。突然変異または環境の影響によって後の世代にはある変化が生じる可能性があるため、そのような子孫は実際には親細胞と同一ではないと考えられるが、本明細書で使用される用語の範囲内に包含される。

【0157】

宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞でよい。例えば93870タンパク質は、E. coliなどの細菌細胞や昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）、またはCOS細胞内で発現することができる。その他の適切な宿主細胞は当業者に知られている。

【0158】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技法により宿主細胞に導入することができる。本明細書で使用する「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAEデキストラン仲介型トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含めた、異種核酸（例えばDNA）を宿主細胞に導入するための、当技術分野で理解されている様々な技法を指すものとする。

【0159】

本発明の宿主細胞は、93870タンパク質を生成（すなわち発現）するために使用することができる。したがって、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して93870タンパク質を生成するための方法を提供する。一実施形態で、この方法は、93870タンパク質が生成されるように、適切な培地で、本発明の宿主細胞（93870タンパク質をコードする組換え発現ベクターがその内部に導入される）を培養することを含む。別の実施形態で、この方法はさらに、培地または宿主細胞から93870タンパク質を単離することを含む。

【0160】

別の実施形態で、本発明は、93870導入遺伝子を含みまたは別の方法で93870を誤発現する細胞または細胞の精製調製物を特徴とする。細胞調製物は、ヒト細胞または非ヒト細胞、例えば齧歯類細胞、例えばマウスやラットの細胞、ウサギ細胞、ブタ細胞からなるものでよい。好ましい実施形態で、これらの細胞は93870導入遺伝子を含み、例えば93870の非相同形態を含み、例えばヒトから得られた遺伝子を含む（この場合、非ヒト細胞である）。93870導入遺伝子は、異常発現する可能性があり、例えば過発現や発現不足が生じる可能性がある。その他の好ましい実施形態で、これらの細胞は、内因性93870を異常発現する遺伝子、例えばその発現が妨害され例えばその発現が不可能になる遺伝子を含む。そのような細胞は、突然変異または異常発現した93870対立遺伝子に関連する障害について研究するための、または薬物スクリーニングで使用するためのモデルとして働くことができる。

【0161】

別の態様で、本発明は、ヒト細胞、例えば造血幹細胞であって、被験93870ポリペプチドをコードする核酸で形質転換されたものを含む。

【0162】

また、細胞、好ましくはヒト細胞であって、例えばヒト造血細胞や線維芽細胞など、通常は内因性93870遺伝子の発現を制御しない調節配列の制御下に内因性93870があるものも提供される。例えば細胞系や微生物など細胞内の内因性遺伝子の発現特性は、細胞のゲノムに異種DNA調節要素を挿入し、挿入された調節要素が内因性93870遺伝子に動作可能に結合できるようにすることによって、変更することができる。例えば通常

10

20

30

40

50

は発現せず、または非常に低いレベルでしか発現しないような、「転写上サイレントな」内因性 93870 遺伝子は、その細胞内で正常発現した遺伝子産物の発現を促進させることが可能な調節要素に挿入することによって、活性化することができる。記述されるような（例えば米国特許第 5,272,071 号；PCT 公開第 WO91/06667 号）異種 DNA を挿入するには、標的相同組換えなどの技法を使用することができる。

【0163】

トランスジェニック動物

本発明は、非ヒトトランスジェニック動物を提供する。そのような動物は、93870 タンパク質の機能および/または活性の研究に有用であり、93870 活性のモジュレーターを同定しかつ/または評価するのに有用である。本明細書で使用する「トランスジェニック動物」は、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはラットやマウスなどの齧歯類であって、その動物の細胞の 1 つまたは複数が導入遺伝子を含むものである。トランスジェニック動物のその他の例には、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、外因性 DNA または再配列、例えば内因性染色体 DNA の欠失であって、好ましくは、トランスジェニック動物の細胞のゲノムに組み込まれまたはそこに生じるものである。ある導入遺伝子は、トランスジェニック動物の 1 つまたは複数の細胞タイプまたは組織においてコードされた遺伝子産物の発現を支配することができ、その他の導入遺伝子、例えばノックアウトは、発現を低下させる。したがってトランスジェニック動物は、例えば内因性遺伝子と動物の細胞に導入された外因性 DNA 分子との相同組換えによって、内因性 93870 遺伝子が増加したものでよい（例えば動物の発生の前の動物の胚細胞）。 10 20

【0164】

導入遺伝子の発現効率を高めるため、導入遺伝子にはイントロン配列およびポリアデニル化シグナルも含めることができる。組織特異的調節配列は、93870 タンパク質の発現を特定の細胞に向けて行うことができるよう、本発明の導入遺伝子に作動可能に結合することができる。トランスジェニック創始動物は、そのゲノム中の 93870 導入遺伝子の存在、および/またはその動物の組織または細胞での 93870 mRNA の発現に基づいて確認することができる。次いでトランスジェニック創始動物を使用して、その導入遺伝子を持つ追加の動物を繁殖させることができる。さらに、93870 タンパク質をコードする導入遺伝子を持ったトランスジェニック動物をさらに繁殖させて、他の導入遺伝子を持つ他のトランスジェニック動物にすることができる。 30

【0165】

93870 タンパク質またはポリペプチドは、トランスジェニック動物または植物内で発現させることができ、例えばタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸を、動物のゲノムに導入することができる。好ましい実施形態では、核酸を組織特異的プロモーター、例えば乳や卵に特異的なプロモーターの制御下に配置し、その動物により生産された乳または卵から回収する。適切な動物は、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、およびヒツジである。

【0166】

本発明は、本明細書で述べるトランスジェニック動物から得た細胞の個体群も含む。 40

【0167】

使用

本明細書で述べる核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体は、以下の方法、すなわち a) スクリーニング・アッセイ、b) 予知医学（例えば診断アッセイや予後アッセイ、臨床試験のモニター、遺伝薬理学など）、および c) 処置方法（例えば治療や予防）の 1 つまたは複数で使用することができる。本発明の単離核酸分子は、以下にさらに詳細に述べるように、例えば 93870 タンパク質を発現させ（例えば遺伝子治療の適用分野における宿主細胞内での組換え発現ベクターによる）、93870 mRNA を検出し（例えば生体サンプル中で）、93870 遺伝子での遺伝的变化を検出し、93870 活性をモジュレートするのに使用することができる。93870 タンパク質は、93870 50

基質の不十分なまたは過剰な生成、あるいは93870阻害剤の生成を特徴とする障害の治療に使用することができる。さらに、93870タンパク質は、天然93870基質のスクリーニング、93870活性をモジュレートする薬物または化合物のスクリーニング、ならびに93870タンパク質の不十分なまたは過剰な生成あるいは93870野生型タンパク質に比べて活性が少なく異常でありまたは望ましくない93870タンパク質形態の生成を特徴とする障害の治療に使用することができる。例示的な障害には、Gタンパク質共役型受容体活性が異常であるもの（例えば先天性定常的夜盲症や心筋症、家族性腎性尿崩症）が含まれる。さらに、本発明の抗93870抗体は、93870タンパク質の検出および単離、93870タンパク質の生物学的利用能の調節、および93870活性のモジュレーションに使用することができる。

10

【0168】

被験93870ポリペプチドと相互に作用する能力、例えば結合する能力に関し、化合物を評価する方法が提供される。この方法は、被験93870ポリペプチドに化合物を接触させること、および化合物が被験93870ポリペプチドと相互に作用し、例えば結合しまたは複合体を形成する能力を評価することを含む。この方法は、例えば細胞を含まない系など生体外で、または2-ハイブリッド相互作用トラップ・アッセイなど生体内で実行することができる。この方法は、被験93870ポリペプチドと相互に作用する自然に生ずる分子を同定することができる。この方法は、被験93870ポリペプチドの天然または合成阻害剤を見出すのにも使用することができる。スクリーニング方法を、以下により詳細に論じる。

20

【0169】

スクリーニング・アッセイ

本発明は、モジュレーター、すなわち候補または試験化合物または物質（例えばタンパク質やペプチド、ペプチド類似体、ペプトイド、小分子、その他の薬剤）であって、93870タンパク質に結合し、例えば93870発現や93870活性に刺激的なまたは阻害的な影響を及ぼし、または例えば93870基質の発現や活性に刺激的なまたは阻害的な影響を及ぼすものを同定するための、スクリーニング方法（本明細書では「アッセイ」とも呼ぶ）を提供する。このように同定された化合物を使用して、治療プロトコルで標的遺伝子産物（例えば93870遺伝子）の活性をモジュレートし、標的遺伝子産物の生物学的機能を作り出し、または正常な標的遺伝子相互作用を妨害する化合物を同定することができる。

30

【0170】

一実施形態で、本発明は、93870タンパク質またはポリペプチドの基質あるいはその生体活性部分である候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施形態で、本発明は、93870タンパク質またはポリペプチドあるいはその生体活性部分に結合しまたはモジュレートする候補または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

【0171】

本発明の試験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプトイド・ライブラリー（ペプチド官能基を有するが、酵素分解しにくいにも関わらず生体活性を維持する新規な非ペプチド主鎖を有する分子のライブラリー；例えばZuckermann他（1994）J. Med. Chem. 37: 2678~2685）；空間的にアドレス可能な平行固相または液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「ワンピース・ワンコンパウンド」ライブラリー法；およびアフィニティ・クロマトグラフィ選択を使用する合成ライブラリー法も含め、当技術分野で知られているコンビナトリアル・ライブラリー法での数多くの手法のいずれかを使用して得ることができる。生物学的ライブラリーおよびペプトイド・ライブラリーの手法はペプチド・ライブラリーに限られるが、その他4つの手法はペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに利用可能である（Lam、1997、Anticancer Drug Des. 12: 145）。

40

50

【0172】

分子ライブラリーを合成する方法の例は、既に記載されている（例えばDeWitt他（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909；Erb他（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422；Zuckermann他（1994）J. Med. Chem. 37:2678；Cho他（1993）Science 261:1303；Carrell他（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059；Carrell他（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061；およびGallop他（1994）J. Med. Chem. 37:1233）。

【0173】

化合物のライブラリーは、溶解状態で（例えばHoughten（1992）Biotechniques 13:412~421）、あるいはビーズ（Lam（1991）Nature 354:82~84）、チップ（Fodor、1993、Nature 364:555~556）、細菌（米国特許第5,223,409号）、孢子（米国特許第5,223,409号）、プラスミド（Cull他（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865~1869）上に、またはファージ（Scott他（1990）Science 249:386~390；Devlin（1990）Science 249:404~406；Cwirlla他（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378~6382；Felici（1991）J. Mol. Biol. 222:301~310；米国特許第5,223,409号）上に存在

10

20

【0174】

一実施形態で、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、93870タンパク質またはその生体活性部分を発現する細胞を試験化合物に接触させて、試験化合物が93870活性をモジュレートする能力を決定する。試験化合物が93870活性をモジュレートする能力の決定は、例えば酵素活性の変化をモニターすることによって実現することができる。例えば細胞は、哺乳動物由来のものでよい。

【0175】

試験化合物が、93870基質などの化合物に対する93870結合をモジュレートしまたは93870に結合する能力も、評価することができる。これは、例えば基質などの化合物と放射性同位元素または酵素標識とを結合して、複合体中の基質などの標識化合物を検出することにより、基質などの化合物と93870との結合を決定できるようにすることによって実現される。あるいは93870を放射性同位元素または酵素標識に結合し、それによって、試験化合物が複合体中の93870基質に対する93870結合をモジュレートする能力をモニターすることができる。例えば化合物（例えば93870基質）は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的または間接的に標識することができ、放射性同位元素は、放射放出を直接カウントすることによって、またはシンチレーション・カウントすることによって検出できる。あるいは化合物を、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼやアルカリ性ホスファターゼ、ルシフェラーゼで酵素標識することができ、酵素標識は、適切な基質から生成物への変換を決定することによって検出される。

30

40

【0176】

相互作用物のいずれかの標識を用いてまたは用いずに、93870と相互に作用する化合物（例えば93870基質）の能力を、評価することができる。例えば、化合物または93870を標識せずに、化合物と93870との相互作用を検出するには、マイクロフィジオメーターを使用することができる（McConnell他（1992）Science 257:1906~1912）。本明細書で使用する「マイクロフィジオメーター」（例えばCytosensor）は、光アドレス可能な電位差検出センサー（LAPS）を使用して細胞がその環境を酸化する速度を測定する分析機器である。この酸化速度の変化を、化合物と93870との相互作用の指標として使用することができる。

【0177】

50

さらに別の実施形態では、無細胞アッセイが提供されるが、この場合、93870タンパク質またはその生体活性部分を試験化合物に接触させ、93870またはその生体活性部分に結合する試験化合物の能力を評価する。本発明のアッセイで使用される93870タンパク質の好ましい生体活性部分は、非93870分子との相互作用に寄与する断片、例えば表面確率スコアの高い断片を含む。

【0178】

本発明の無細胞アッセイでは、単離したタンパク質（例えば93870タンパク質やその生体活性部分）の可溶性および/または膜結合形態を使用することができる。膜結合形態のタンパク質を使用する場合、可溶化剤を利用することが望ましいと考えられる。そのような可溶化剤の例には、*n*-オクチルグルコシド、*n*-ドデシルグリコシド、*n*-ドデシルマルチド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton（登録商標）X-100、Triton（登録商標）X-114、Thesit（登録商標）、イソトリデシルポリ（エチレングリコールエーテル）*n*、3-（3-コルアミドプロピル）ジメチルアミノオ-1-プロパンスルホネート（CHAPS）、3-（3-コルアミドプロピル）ジメチルアミノオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（CHAPSO）、またはN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートなどの非イオン性界面活性剤が含まれる。

10

【0179】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質と試験化合物とが相互に作用して結合し、それによって除去しかつ/または検出することができる複合体が形成されるような条件下および十分な時間で、これら2成分の反応混合物を調製することを含む。

20

【0180】

2種の分子の相互作用は、蛍光エネルギー伝達（FET；例えば米国特許第5,631,169号；米国特許第4,868,103号）を使用して検出することもできる。蛍光団標識は、第1のドナー分子の放出蛍光エネルギーが第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識に吸収され、その吸収されたエネルギーによって蛍光が発せられるように、選択される。あるいは「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の自然の蛍光エネルギーのみ利用することができる。種々の光の波長を放出する標識は、「アクセプター」分子標識が「ドナー」のもとで区別できるように選択される。標識間のエネルギー伝達効率は、分子を隔てる距離に関連しているため、分子同士の空間的な関係性を評価することができる。分子間に結合が生じる状況では、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光放出が最大であるべきである。FET結合事象は、当技術分野で周知の標準的な蛍光検出手段によって（例えば蛍光計を使用して）、都合良く測定することができる。

30

【0181】

別の実施形態で、標的分子に結合する93870タンパク質の能力の測定は、実時間生体分子相互作用分析（BIA；例えばSjolander他（1991）Anal.Chem.63:2338~2345；Szabo他（1995）Curr.Opin.Struct.Biol.5:699~705）を使用して行うことができる。「表面プラズモン共鳴」（SPR）または「BIA」は、いかなる相互作用物（例えばBIACore）も標識することなく、生体に特異的な相互作用を実時間で検出する。結合表面での質量の変化（結合事象を示す）は、その表面付近の光の屈折率（SPRの光学的現象）に変化をもたらす、その結果、生体分子間の実時間反応の指標として使用できる検出可能なシグナルが得られる。

40

【0182】

一実施形態では、標的遺伝子産物または試験物質を固相に固着する。固相に固着された標的遺伝子産物/試験化合物複合体は、反応の終わりに検出することができる。標的遺伝子産物は、固体表面に固着することが好ましく、試験化合物（固着されていない）は、本明細書で論じる検出可能な標識で直接的または間接的に標識することができる。

【0183】

93870、抗93870抗体、またはその標的分子を固定化して、タンパク質の一方ま

50

たは両方の複合形態を非複合形態から容易に分離できるようにし、ならびにアッセイの自動化が可能になるようにすることが望ましい。候補化合物が存在しまたは存在しない状態での、試験化合物と93870タンパク質との結合、または93870タンパク質と標的分子との相互作用は、反応体を入れるのに適する任意の容器内で行うことができる。そのような容器の例には、微量定量プレート、試験管、および微量遠心管が含まれる。一実施形態では、タンパク質の1つまたは両方をマトリックスに結合させるドメインを付加する融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/93870融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオン Sepharose (商標) ビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導化微量定量プレートに吸着させることができ、次いでこれを試験化合物、または試験化合物と非吸着標的タンパク質または93870タンパク質のいずれかと合わせ、その混合物を、複合体形成が実行される条件下でインキュベートする (例えば塩およびpHが生理的な条件で)。インキュベーション後、ビーズまたは微量定量プレートのウェルを洗浄していかなる非結合成分も除去し、ビーズの場合はマトリックスを固定し、例えば上述のように直接的または間接的に複合体を判別する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させることができ、93870結合または活性のレベルを標準的な技法を使用して決定する。

10

【0184】

93870タンパク質または標的分子をマトリックスに固定化するためのその他の技法は、ピオチンとストレプトアビジンの接合を使用することを含む。ピオチニル化93870タンパク質または標的分子は、当技術分野で知られている技法 (例えばピオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL) を使用して、ピオチン-N-ヒドロキシ-スクシンイミドから調製することができ、ストレプトアビジンで被覆した96ウェル・プレート (Pierce Chemical) のウェル内に固定することができる。

20

【0185】

アッセイを実行するために、固定化していない成分を、固着された成分を含む被覆済みの表面に付加する。反応終了後、形成された全ての複合体が固体表面に固定されたままになるような条件下で、未反応成分を除去する (例えば洗浄することによって)。固体表面に固着した複合体の検出は、いくつかの方法で行うことができる。予め固定化していない成分を事前に標識した場合、表面に固定化した標識を検出したことは、複合体が形成されたことを示している。予め固定化していない成分を事前に標識しない場合、間接標識、例えば固定化成分に特異的な標識済み抗体を使用して、表面に固着された複合体を検出することができる (抗体は、直接的または間接的に標識することができ、例えば標識抗Ig抗体がある)。

30

【0186】

一実施形態で、このアッセイは、93870タンパク質または標的分子と反応する抗体であって、かつ93870タンパク質とその標的分子との結合を妨げない抗体を利用して行う。そのような抗体は、プレートのウェルに誘導体化することができ、結合していない標的または93870タンパク質を、抗体接合によってウェル内に捕えることができる。そのような複合体を検出するための方法は、GST固定化複合体に関して既に述べたものその他、93870タンパク質または標的分子との抗体反応を使用した複合体の免疫検出、ならびに93870タンパク質または標的分子に関連した酵素活性の検出を利用する酵素結合アッセイを含む。

40

【0187】

あるいは、無細胞アッセイを液相で実行することができる。そのようなアッセイでは、分画遠心法 (例えばRivas他 (1993) Trends Biochem. Sci. 18: 284~287); クロマトグラフィ (例えばゲル濾過クロマトグラフィやイオン交換クロマトグラフィ); 電気泳動 (例えばAusubel他編 (1999) Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley

50

、New York) ; および免疫沈降 (例えば前掲の Ausubel) を含むがこれらに限定されない多くの標準的な技法のいずれかによって、反応生成物を未反応成分から分離する。そのような樹脂およびクロマトグラフィ技法は、当業者に知られている (例えば Heegaard、1998、J. Mol. Recognit. 11: 141~148 ; Hage 他 (1997) J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 699: 499~525)。さらに、溶液から複合体をさらに精製することなく結合を検出するには、本明細書で述べた蛍光エネルギー伝達も都合良く利用することができる。

【0188】

好ましい実施形態で、アッセイは、93870タンパク質またはその生体活性部分と、93870に結合する既知の化合物とを接触させて、アッセイ混合物を形成すること、アッセイ混合物と試験化合物を接触させること、および試験化合物が93870タンパク質と相互に作用する能力を測定することを含み、この試験化合物が93870タンパク質と相互に作用する能力を測定することは、既知の化合物に比べ、試験化合物が93870またはその生体活性部分に優先的に結合する能力または標的分子の活性をモジュレートする能力を測定することを含む。

10

【0189】

本発明の標的遺伝子は、タンパク質など1つまたは複数の細胞または細胞外高分子と生体内で相互に作用することができる。これを論ずるにあたり、そのような細胞および細胞外高分子を本明細書では「結合パートナー」と呼ぶ。そのような相互作用を妨害する化合物は、標的遺伝子産物の活性を調節するのに有用と考えられる。そのような化合物には、抗体やペプチド、小分子などの分子が含まれるがこれらに限定されない。この実施形態で使用される好ましい標的遺伝子/生成物は、本明細書で明らかにされた93870遺伝子である。代替の実施形態で、本発明は、93870標的分子の下流エフェクターの活性のモジュレーションによって、試験化合物が93870タンパク質の活性をモジュレートする能力を決定するための方法を提供する。例えば上述のようにして、適切な標的上のエフェクター分子の活性を決定することができ、またはエフェクターと適切な標的との結合を決定することができる。

20

【0190】

標的遺伝子産物とその細胞または細胞外結合パートナーとの相互作用を妨げる化合物を同定するため、標的遺伝子産物とその結合パートナーとを含有する反応混合物を、その2つの生成物で複合体が形成されるような条件下で十分な時間、調製する。阻害剤を試験するために、試験化合物を存在させまた存在させない状態で反応混合物を得る。試験化合物は、初めに反応混合物中に含めることができ、あるいは標的遺伝子およびその細胞または細胞外結合パートナーを添加した後に添加することができる。試験化合物なしで、または偽薬と共に、対照反応混合物をインキュベートする。次いで標的遺伝子産物と細胞または細胞外結合パートナーとの任意の複合体の形成を検出する。対照反応であるが試験化合物を含有する反応混合物ではない場合の複合体の形成は、化合物が、標的遺伝子産物とその相互作用的結合パートナーとの相互作用を妨げることを示す。さらに、試験化合物および正常な標的遺伝子産物を含有する反応混合物内での複合体の生成も、試験化合物および突然変異標的遺伝子産物を含有する反応混合物内での複合体形成と比較することができる。この比較は、突然変異体であるが正常ではない標的遺伝子産物の相互作用を妨げる化合物を同定することが望ましい場合に重要と考えられる。

30

40

【0191】

これらのアッセイは、不均質または均質なフォーマットで実行することができる。不均質アッセイは、標的遺伝子産物または結合パートナーを固相に固着し、反応の終わりに固相に固着された複合体を検出することを含む。均質アッセイでは、全反応を液相で実行する。どちらの手法でも、試験される化合物に関して種々の情報が得られるよう、反応体を添加する順序は様々でよい。例えば、競合などによって標的遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を妨げる試験化合物は、試験物質の存在下で反応を実行することにより同定す

50

ることができる。あるいは、前もって形成された複合体を壊す試験化合物、例えば複合体からの成分の1つを置換する結合定数が高い化合物は、複合体が形成された後に、反応混合物に試験化合物を添加することによって試験をすることができる。様々なフォーマットについて以下に簡単に述べる。

【0192】

不均質アッセイ・システムでは、標的遺伝子産物または相互に作用する細胞または細胞外結合パートナーを固体表面（例えば微量定量プレート）に固着し、一方、非固着種には直接的または間接的に標識を施す。固着種は、非共有または共有結合によって固定化することができる。あるいは、固着される種に特異的な固定化抗体を使用して、これらの種を固体表面に固着することができる。

10

【0193】

アッセイを実施するため、固定化種のパートナーを、試験化合物で被覆されまたは被覆されていない表面に曝す。反応終了後、未反応成分を除去し（例えば洗浄によって）、形成された全ての複合体が固体表面に固定化することになる。非固定化種に予め標識した場合、表面に固定化された標識が検出されることは、複合体が形成されたことを示している。非固定化種に予め標識しない場合は、間接標識を使用し、例えば当初非固定化種に特異的な標識抗体を使用して、表面に固着された複合体を検出することができる（抗体は、例えば標識抗Ig抗体で直接的に標識しまたは間接的に標識することができる）。反応成分の添加順序に応じ、複合体の形成を阻害しまたは事前に形成された複合体を壊す試験化合物を検出することができる。

20

【0194】

あるいは、反応は、試験化合物を存在させまたは存在させない状態で液相で行うことができ、反応生成物を未反応成分から分離して、例えば溶液中に形成された任意の複合体を固着させる結合成分の1つに特異的な固定化抗体、および固着した複合体を検出するその他のパートナーに特異的な標識抗体を使用して複合体を検出することができる。この場合も、液相への反応体の添加順序に応じて、複合体を阻害しまたは事前に形成された複合体を壊す試験化合物を同定することができる。

【0195】

本発明の代替の実施形態では、均質アッセイを使用することができる。例えば、標的遺伝子産物と、相互作用する細胞または細胞外結合パートナー産物との事前に形成された複合体は、標的遺伝子産物またはその結合パートナーが標識された状態で調製するが、その標識によって生成されたシグナルは、複合体の形成によって消えないものである（例えば、免疫アッセイのためこの手法を利用する米国特許第4,109,469号）。事前に形成された複合体からの様々な種の1つと競合し置換する試験物質の添加により、バックグラウンド上にシグナルが生成されることになる。このように、標的遺伝子産物 - 結合パートナーの相互作用を妨げる試験物質を同定することができる。

30

【0196】

さらに別の態様では、ツーハイブリッド・アッセイまたはスリーハイブリッド・アッセイで93870タンパク質を「ベイト (bait) タンパク質」として使用して（例えば米国特許第5,283,317号; Zervos他(1993) Cell 72:223~232; Madura他(1993) J. Biol. Chem. 268:12046~12054; Bartel他(1993) Biotechniques 14:920~924; Iwabuchi他(1993) Oncogene 8:1693~1696; PCT公開番号WO94/10300)、93870に結合しまたはそれと相互に作用するその他のタンパク質（「93870結合タンパク質」または「93870-bp」）および93870活性に関与するその他のタンパク質を同定することができる。そのような93870-bpは、例えば93870仲介型シグナル伝達経路の下流要素としての93870タンパク質または93870標的によるシグナルの活性化剤または阻害剤でよい。

40

【0197】

ツーハイブリッド系は、分離可能なDNA結合および活性化ドメインからなる、ほとんど

50

の転写因子のモジュレーターの性質に基づく。簡単に言えば、アッセイは、2つの異なるDNA構成を利用する。一方の構成では、93870タンパク質をコードする遺伝子が、既知の転写因子のDNA結合ドメイン(例えばGAL-4)をコードする遺伝子に融合する。他方の構成では、明らかにされていないタンパク質(「プレイ(pre y)」または「サンプル」)をコードするDNA配列のライブラリーからのDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合する(あるいは、93870タンパク質を活性化剤ドメインに融合することができる)。「ベイト」および「プレイ」タンパク質は、生体内で相互に作用して93870依存型複合体を形成し、転写因子のDNA結合および活性化剤ドメインが非常に接近した状態に配置される。このように接近して配置されることにより、転写因子に応答する転写調節部位に動作可能に結合されたレポーター遺伝子(例えばLacZ)の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出することができ、機能的転写因子を含む細胞群体を単離して、93870タンパク質と相互に作用するタンパク質をコードするクローニング遺伝子を得るのに使用することができる。

10

【0198】

別の実施形態では、93870発現のモジュレーターを同定する。例えば、細胞混合物または無細胞の混合物を候補化合物に接触させ、93870 mRNAまたはタンパク質の発現を、候補化合物が存在しない場合の93870 mRNAまたはタンパク質の発現レベルに対して評価する。候補化合物が存在する場合の93870 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物がない場合よりも多い場合、その候補化合物は、93870 mRNAまたはタンパク質発現の刺激物質であることが確認される。あるいは、候補化合物の存在下での93870 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物がないときよりも少ない場合(すなわち統計的に有意な状態で少ない)、その化合物は、93870 mRNAまたはタンパク質発現の阻害剤であることが確認される。93870 mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、本明細書で述べた93870 mRNAまたはタンパク質を検出するための方法によって、決定することができる。

20

【0199】

別の態様で、本発明は、本明細書で述べたアッセイの2つ以上の組合せに関する。例えばモジュレーション物質は、細胞ベースまたは無細胞のアッセイを使用して同定することができ、その物質が93870タンパク質の活性をモジュレートする能力は、例えばある疾病に関する動物モデルなどの動物の生体内で確認することができる。

30

【0200】

本発明はさらに、上述のスクリーニング・アッセイによって同定される新規な物質に関する。したがって、本明細書で述べたように明らかにされた物質(例えば93870モジュレーション物質、アンチセンス93870核酸分子、93870特異的抗体、または93870結合パートナー)を適切な動物モデルで使用して、そのような物質を用いた治療の効能、毒性、副作用、または作動メカニズムを決定することは、本発明の範囲内に包含される。さらに、上述のスクリーニング・アッセイにより同定された新規な物質を、本明細書で述べる治療に使用することができる。

【0201】

検出アッセイ

本明細書で明らかにされた核酸配列の一部または断片は、ポリヌクレオチド試薬として使用することができる。例えば、これら配列を使用して、(i)遺伝病に関連する遺伝子領域を位置付けしまたは93870を病気に関連付けるなどするため、染色体上のそれぞれの遺伝子をマップし、(ii)極めて小さい生体サンプルから個体を同定し(組織型別)、(iii)生体サンプルの法医学的特定を助けることができる。これらの適用例について、以下のサブセクションで述べる。

40

【0202】

染色体マッピング

93870ヌクレオチド配列またはその一部を使用して、染色体上の93870遺伝子の位置をマップすることができる。このプロセスは、染色体マッピングと呼ばれる。染色体

50

マッピングは、93870配列と病気に関連する遺伝子とを相互に関連付けるのに有用である。

【0203】

簡単に言うと、93870遺伝子は、93870ヌクレオチド配列(例えば配列番号1や配列番号2)からPCRプライマー(好ましくは長さが15~25塩基対)を調製することによって、染色体上にマップすることができる。次いでこのようなプライマーを、個々のヒト染色体を含有する融合体細胞のPCRスクリーニングに使用することができる。93870配列に対応するヒト遺伝子を含有するこのようなハイブリッドのみが、増幅断片をもたらすことになる。

【0204】

各細胞系が単一のヒト染色体または少数のヒト染色体および一組のマウス染色体を含有する融合体細胞のパネルにより、個々の遺伝子を特定のヒト染色体上に容易にマッピングすることが可能になる(D'Eustachio他(1983)Science 220:919~924)。

【0205】

その他のマッピング戦略、例えば記述されるような(Fan他(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6223~6227)in situハイブリダイゼーションや、標識済みのフローソートされた染色体による事前スクリーニング、染色体特異的cDNAライブラリーへのハイブリダイゼーションによる事前選択などを使用して、93870を染色体位置にマップすることができる。

【0206】

中期染色体スプレッドに対するDNA配列の蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)をさらに使用して、1ステップで精密な染色体位置を得ることができる。FISH技法は、500~600塩基程度に短いDNA配列と共に使用することができる。しかし、1,000塩基よりも大きいクローンは、簡単な検出を行うのに十分なシグナル強度を持つ独自の染色位置に結合する可能性が高い。妥当な時間で良好な結果を得るには、好ましくは1,000塩基、より好ましくは2,000塩基で十分である(FISHの概略に関しては、Verma他(1988)Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New Yorkを参照されたい)。

【0207】

染色体マッピング用の試薬を個々に使用して、単一の染色体またはその染色体上の単一の部位をマークすることができ、あるいは、試薬のパネルを使用して、複数の部位および/または複数の染色体をマークすることができる。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、一般にマッピングを行うのに好ましい。コード配列は遺伝子ファミリー内に保存され易く、したがって染色体マッピング中にクロス・ハイブリダイゼーションの機会が増大する。

【0208】

配列が、精密な染色体位置にマップされると、その配列の染色体上での物理的な位置を遺伝子マップのデータに相関させることができる(そのようなデータは、例えばJohns Hopkins University Welch Medical Libraryからオンラインで入手可能なV. McKusick, Mendelian Inheritance in Manに見られる)。次いで同じ染色体領域にマップされた遺伝子と病気との関係を、記載されている(例えばEgeland他、1987、Nature、325:783~787)連鎖解析(物理的に隣接する遺伝子の相互遺伝)によって明らかにすることができる。

【0209】

さらに、93870遺伝子に関連する病気の影響を受けまたは受けない個体間のDNA配列の差を決定することができる。影響を受けた個体の一部または全てであって影響を受けていない個体のいずれでもないものに突然変異が観察された場合、その突然変異は特定の

10

20

30

40

50

病気の原因物質になり易い。影響を受けた個体と影響を受けていない個体との比較では、一般に、染色体スプレッドから目で見ることができまたはDNA配列に基づくPCRを使用して検出することができる欠失や転座など、染色体の構造変化を最初に探すことが必要である。最終的に、いくつかの個体から得た遺伝子の完全な配列決定は、突然変異の存在が確認されるように、また突然変異と多型とが区別されるように、実行することができる。

【0210】

組織分類

93870タンパク質は、例えば制限酵素断片長多型(RFLP)を使用して生体サンプルからの個体を同定するのに使用することができる。この技法では、個体のゲノムDNAを1種または複数の制限酵素で消化し、例えばサザンブロット法で断片を分離し、同定用のバンドが得られるようプローブする。本発明の配列は、RFLP用の追加のDNAマーカーとして有用である(米国特許第5,272,057号に記載)。

10

【0211】

さらに本発明の配列は、個体のゲノムの選択部分の、実際の塩基ごとのDNA配列を決定するのに使用することができる。このため、本明細書で述べる93870ヌクレオチド配列を使用して、配列の5'-および3'-末端に相同なPCRプライマーを調製することができる。次いでこのようなプライマーを使用して、個体のDNAを増幅し、その後、その配列を決定することができる。このように調製された個体からの対応するDNA配列のパネルは、対立遺伝子の相違によってそのようなDNA配列の独自の組を各個体が有するので、独自の個体同定を行うことができる。

20

【0212】

対立遺伝子の変種は、これらの配列のコード領域にある程度まで生じ、非コード領域にはかなりの程度で生じる。本明細書で述べる配列のそれぞれは、同定のため個体からのDNAを比較する標準として、ある程度まで使用することができる。より多くの多型が非コード領域に生ずるので、個体を差別化するにはより少ない配列が必要である。配列番号1の非コード配列は、それぞれが100塩基の非コード増幅配列をもたらすものであっておそらくは10~1,000プライマーのパネルによって、確実な個体同定を行うことができる。配列番号3のように、予測されるコード配列を使用する場合、確実な個体同定を行うためにより適切な数のプライマーは、500~2,000と考えられる。

30

【0213】

本明細書で述べる93870ヌクレオチド配列からの試薬のパネルを使用して個体に関する独自の同定データベースを生成する場合、同じ試薬を後で使用して、その個体からの組織を確認することができる。独自の同定データベースを使用することによって、生きておりまたは死んでいる個体の確実な同定を、極めて小さい組織サンプルから行うことができる。

【0214】

法生物学での部分93870配列の使用

DNAベースの同定技法は、法生物学でも使用することができる。そのような同定を行うには、PCR技術を使用して、犯罪現場で発見されるような髪や皮膚などの組織、また例えば血液や唾液、精液などの体液といった、非常に小さい生体サンプルから得られたDNA配列を増幅することができる。次いで増幅した配列を標準物質と比較することができ、それによって、生体サンプルの出所の特定が可能なる。

40

【0215】

本発明の配列を使用して、ヒトゲノムの特定の遺伝子座を標的としたポリヌクレオチド試薬、例えばPCRプライマーを提供することができ、それによって、例えば別の「同定マーカー」(すなわち、特定の個体に特有の別のDNA配列)を提供することにより、DNAベースの法医学的同定の信頼性を高めることができる。上述のように、実際のヌクレオチド配列情報は、制限酵素で生成された断片によって形成されたパターンの正確な代替物として、同定のために使用することができる。配列番号1の非コード領域を標的とする配

50

列（例えば、長さが少なくとも20ヌクレオチド残基であり、好ましくは少なくとも30ヌクレオチド残基である断片）は、この用途に特に適切である。

【0216】

本明細書で述べる93870ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド試薬、例えば標識されまたは標識可能なプローブであって、例えば *in situ* ハイブリダイゼーション技法で使用して造血細胞を含有する組織など特定の組織を同定することができる試薬を提供するために、さらに使用することができる。これは、出所が未知の組織を法医病理学者が取り扱う場合に非常に役立つと考えられる。そのような93870プローブのパネルを使用して、組織を種および/または器官のタイプで識別することができる。

【0217】

同様に、汚染に関して組織培養物をスクリーニングするために（すなわち培養物中に異なるタイプの細胞の混合物が存在するかどうかをスクリーニングするために）、これらの試薬、例えば93870プライマーまたはプローブを使用することができる。

【0218】

予知医学

本発明は、予後（予知）のため診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験のモニタリングを使用し、それによって個体を治療する、予知医学の分野にも関する。

【0219】

一般に本発明は、被験体が、93870ポリペプチドをコードする遺伝子の病変または誤発現に関連する障害の危険性があるかどうかを決定する方法を提供する。

【0220】

そのような障害には、例えば93870ポリペプチドの誤発現に関連する障害、例えば免疫異常症や腫瘍疾患が含まれる。

【0221】

この方法は、以下の1つまたは複数、すなわち

被験体の組織内で、93870遺伝子の発現に影響を及ぼす突然変異の存否を検出すること、すなわち遺伝子の発現を制御する領域内での突然変異、例えば5'-制御領域内での突然変異の存否を検出すること、

被験体の組織内で、93870遺伝子の構造を変化させる突然変異の存否を検出すること、

被験体の組織内で、mRNAレベルでの93870遺伝子の誤発現を検出すること、例えば非野生型レベルのmRNAを検出すること、および

被験体の組織内で、タンパク質レベルでの遺伝子の誤発現を検出すること、例えば非野生型レベルの93870ポリペプチドを検出することの1つまたは複数を含む。

【0222】

好ましい実施形態で、この方法は、93870遺伝子からの1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、遺伝子への1つまたは複数のヌクレオチドの挿入、点突然変異、例えば遺伝子の1つまたは複数のヌクレオチドの置換、遺伝子の全体的な染色体配列換え、例えば転座や逆位、欠失などの、少なくとも1つの存在を確認することを含む。

【0223】

例えば遺伝的病変の検出は、(i)配列番号1、またはその自然に生ずる突然変異体からの、センスまたはアンチセンス配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域、あるいは93870遺伝子にもともと関連付けられている5'-または3'-フランキング配列を含有するオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマーを提供すること、(ii)プローブ/プライマーを組織の核酸に暴露すること、および核酸へのプローブ/プライマーのハイブリダイゼーションによって、例えば *in situ* ハイブリダイゼーションによって、遺伝的病変の存否を検出することを含むことができる。

【0224】

好ましい実施形態で、誤発現の検出は、93870遺伝子のメッセンジャーRNA転写レベルの変化、遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプライシング・パターンの

10

20

30

40

50

存在、あるいは93870 RNAまたはタンパク質の非野生型レベルの少なくとも1つの存在を確認することを含む。

【0225】

本発明の方法は、出生前スクリーニング、すなわち被験体の子孫が障害を負う危険性があるか否かを決定するのに使用することができる。

【0226】

好ましい実施形態で、この方法は、93870遺伝子の構造、障害を負う危険性を示す異常な構造を判別することを含む。

【0227】

好ましい実施形態で、本方法は、被験体からのサンプルを93870タンパク質または核酸に対する抗体に接触させて、特に遺伝子とハイブリダイズさせることを含む。これらおよびその他の実施形態について以下に論じる。 10

【0228】

診断および予後アッセイ

生体サンプル中の93870タンパク質または核酸の存在、レベル、または不在は、試験対象から生体サンプルを得て、93870タンパク質または核酸の存在が生体サンプル中で検出されるようにその生体サンプルを、93870タンパク質または93870タンパク質をコードする核酸(例えばmRNAやゲノムDNA)を検出することができる化合物または薬剤に接触させることによって評価することができる。「生体サンプル」という用語は、被験体から分離した組織、細胞、および生物学的流体、ならびに被験体内に存在する組織、細胞、および体液を含む。好ましい生体サンプルは血清である。93870遺伝子の発現レベルは、93870遺伝子でコードしたmRNAの測定、93870遺伝子でコードしたタンパク質の量の測定、または93870遺伝子でコードしたタンパク質の活性の測定を含むがこれらに限定されないいくつかの方法で測定することができる。 20

【0229】

細胞内の93870遺伝子に対応するmRNAのレベルは、*in situ*フォーマットおよび*in vitro*フォーマットの両方により測定することができる。

【0230】

単離したmRNAは、サザンまたはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、およびプローブ・アレイを含むがこれらに限定されないハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイに使用することができる。mRNAレベルを検出するための1つの好ましい診断法では、単離したmRNAを、検出される遺伝子でコードしたmRNAにハイブリダイズできる核酸分子(プローブ)に接触させる。核酸プローブは、例えば配列番号1の核酸など完全長93870核酸や、寄託ヌクレオチド配列、またはその一部であって、長さが少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドでありストリンジエントな条件下で93870 mRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドなどでよい。診断アッセイでの使用に適するその他のプローブについてここに述べる。 30

【0231】

あるフォーマットでは、mRNA(またはcDNA)を表面に固定化してプローブに接触させるが、これは例えば単離したmRNAをアガロースゲル上に流し、そのmRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移すことによって行う。代替のフォーマットでは、プローブを表面に固定化し、mRNA(またはcDNA)を例えば2次元遺伝子チップ・アレイ内でプローブに接触させる。当業者なら、既知のmRNA検出法を、93870遺伝子でコードしたmRNAのレベル検出に利用することができる。 40

【0232】

93870でコードしたサンプル中のmRNAのレベルは、例えばRT-PCR(米国特許第4,683,202号)、リガーゼ連鎖反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189~193)、自律型配列複製(Guattelli他(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:18 50

74~1878)、転写増幅システム(Kwoh他(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:1173~1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardi他(1988)Bio/Technology6:1197)、ローリング・サークル複製(米国特許第5,854,033号)、または任意のその他の核酸増幅法による核酸増幅を行い、その後、当技術分野で知られている技法を使用してその増幅された分子を検出することにより、評価することができる。本明細書で使用する増幅プライマーは、93870遺伝子の5'-または3'-領域(それぞれ正鎖および負鎖、あるいはその逆も同様)にアニールすることができる1対の核酸分子と定義され、それらの間に短い領域を含んでいる。一般に増幅プライマーは、長さが約10~30ヌクレオチドであり、長さが約50~200ヌクレオチドの領域の両側に位置している。適切な条件下で適切な試薬を用いることにより、そのようなプライマーで、プライマー間にヌクレオチド配列を含む核酸分子を増幅することが可能になる。

10

【0233】

in situ法では、細胞または組織のサンプルを調製/処理し、典型的な場合はスライド・ガラスである支持体に固定化し、次いで分析される93870遺伝子をコードするmRNAにハイブリダイズすることができるプローブに接触させる。

【0234】

別の実施形態で、この方法は、93870mRNAまたはゲノムDNAを検出することができる化合物または薬剤に対照サンプルをさらに接触させ、この対照サンプル中の93870mRNAまたはゲノムDNAの存在と、試験サンプル中の93870mRNAまたは

20

【0235】

93870でコードしたタンパク質のレベルを測定するには、様々な方法を使用することができる。一般にこれらの方法は、抗体などのタンパク質に選択的に結合する薬剤をサンプルに接触させて、そのサンプル中のタンパク質のレベルを評価することを含む。好ましい実施形態では、抗体に、検出可能な標識が施されている。抗体はポリクローナルでよく、より好ましくはモノクローナルである。無傷の抗体またはその断片(例えばFabやFab')₂)を使用することができる。プローブまたは抗体に関して「標識した」という用語は、検出可能な物質とプローブまたは抗体とを連結(すなわち物理的結合)することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに検出可能な物質と反応させることによる

30

【0236】

検出方法は、生体サンプル中の93870タンパク質を生体外ならびに生体内で検出するのに使用することができる。93870タンパク質を検出するためのin vitro技法には、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫アッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、およびウェスタンブロット分析が含まれる。93870タンパク質を検出するためのin vivo技法は、標識した抗93870抗体を被験体に導入することを含む。例えば抗体は、被験体内での存在および位置を標準的な画像形成技法により検出することができる放射性マーカーで、標識することができる。

40

【0237】

別の実施形態で、この方法は、93870タンパク質を検出することができる化合物または薬剤に対照サンプルを接触させ、その対照サンプル中の93870タンパク質の存在と試験サンプル中の93870タンパク質の存在を比較することをさらに含む。

【0238】

本発明は、生体サンプル中の93870の存在を検出するためのキットも含む。例えばこのキットは、生体サンプル中および標準物質中の93870タンパク質またはmRNAを検出することが可能な化合物または薬剤を含むことができる。化合物または薬剤は、適切な容器にパックすることができる。キットは、93870タンパク質または核酸を検出す

50

るのにこのキットを使用するための取扱説明書をさらに含むことができる。

【0239】

抗体ベースのキットの場合、このキットは、(1)本発明のマーカースに対応するポリペプチドに結合する第1の抗体(例えば固体支持体に結合されている)と、(2)ポリペプチドまたは第1の抗体に結合し、また検出可能な薬剤に接合される、第2の異なる抗体を含むことができる。

【0240】

オリゴヌクレオチド・ベースのキットの場合、このキットは、(1)本発明のマーカースに対応するポリペプチドをコードする核酸配列にハイブリダイズする、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドなどのオリゴヌクレオチド、または(2)本発明のマーカースに対応する核酸分子の増幅に役立つ1対のプライマーを含むことができる。キットは、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤も含むことができる。キットは、検出可能な薬剤を検出するのに必要な成分(例えば酵素や基質)も含むことができる。キットは、アッセイを行って含有される試験サンプルと比較することができる、対照サンプルまたは一連の対照サンプルを含有することもできる。キットの各構成要素は個々の容器に包封することができ、これら様々な容器の全ては、このキットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための取扱説明書と共に、単一のパッケージ内に含めることができる。

10

【0241】

本明細書で述べる診断方法は、誤発現し、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に関連した疾病または障害があり、あるいはそのような病気または障害を発症する危険性のある被験体を、特定することができる。本明細書で使用する「望ましくない」という用語は、痛みなどの生体応答または細胞増殖の調節解除に關与する望ましくない現象を含む。

20

【0242】

一実施形態では、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に伴う疾病または障害が特定される。試験サンプルを被験体から得て、93870タンパク質または核酸(例えばmRNAやゲノムDNA)について評価するが、この場合、93870タンパク質または核酸のレベル、例えばその存否は、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に伴う疾病または障害があり、あるいはそのような疾病または障害の危険性がある被験体の診断に役立つものである。本明細書で使用する「試験サンプル」は、生物学的流体(例えば血清)、細胞サンプル、または組織も含めた問題の被験体から得られた生体サンプルを指す。

30

【0243】

本明細書で述べる予後アッセイは、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に伴う疾病または障害を治療するために、薬剤(例えば作動薬や拮抗薬、ペプチド模擬体、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、その他の薬物候補)を被験体に投与できるか否か決定する際に使用することができる。例えばそのような方法は、93870発現または活性をモジュレートする薬剤で効果的に被験体を治療できるかどうか決定するのに使用することができる。

【0244】

本発明の方法は、93870遺伝子の遺伝的变化を検出し、それによって、変化した遺伝子を持つ被験体に、ケモカイン相互作用や炎症、神経伝達、光受容、ホルモン受容など93870タンパク質活性または核酸発現の調節ミスの特徴とする障害の危険性があるかどうか判別するのに使用することができる。好ましい実施形態では、この方法は、93870タンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす変化または93870遺伝子の誤発現の少なくとも1つの特徴とする遺伝的变化が、被験体からのサンプル中にあるかどうかを検出することを含む。例えばそのような遺伝的变化は、1)93870遺伝子からの1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、2)93870遺伝子への1つまたは複数のヌクレオチドの付加、3)93870遺伝子の1つまたは複数のヌクレオチドの置換、4)93870遺伝子の染色体再配列、5)93870遺伝子のメッセンジャーmRNA転写

40

50

レベルの変化、6)ゲノムDNAのメチル化パターンなど、93870遺伝子の異常な変更、7)93870遺伝子のメッセンジャーmRNA転写の非野生型スプライシング・パターンの存在、8)93870タンパク質の非野生型レベル、9)93870遺伝子の対立遺伝子欠損、および10)93870タンパク質の不適当な翻訳後修飾の少なくとも1つの存在を確認することによって検出できる。

【0245】

変化は、アンカーPCRやRACE-PCRなどのポリメラーゼ連鎖反応で、あるいは連結連鎖反応(LCR)で、プローブ/プライマーなしで検出することができ、93870遺伝子の点突然変異を検出するには後者が特に有用と考えられる。この方法は、被験体からの細胞サンプルを採取するステップと、そのサンプルから核酸(例えばゲノムやmRNA、またはその両方)を単離するステップと、93870遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下(存在する場合)、93870遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つまたは複数のプライマーに核酸サンプルを接触させるステップと、増幅産物の存否を検出するステップ、または増幅産物のサイズを検出するステップと、その長さを対照サンプルと比較するステップを含むことができる。PCRおよび/またはLCRは、本明細書で述べる突然変異の検出に使用される技法のいずれかと併せて予備増幅ステップとして使用することが望ましいと考えられる。

10

【0246】

代替の増幅方法には、自律型配列複製(Guatelli他(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874~1878)、転写増幅システム(Kwoh他(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173~1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardi他(1988)Bio/Technology 6:1197)、またはその他の核酸増幅法が含まれ、その後で、当業者に知られている技法を使用して、増幅した分子の検出を行う。

20

【0247】

別の実施形態で、サンプル細胞からの93870遺伝子での突然変異は、制限酵素切断パターンの変化を検出することによって確認できる。例えば、サンプルおよび対照DNAを単離し、増幅し(任意選択で)、1つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼで消化し、断片長サイズを、例えばゲル電気泳動によって決定し、比較する。サンプルと対照DNAとの断片長サイズに差があることは、サンプルDNAに突然変異があることを示している。さらに、配列に特異的なリボザイム(例えば米国特許第5,498,531号)の使用は、リボザイム切断部位の発生または欠損による特異的な突然変異の存在のスコアをとるのに使用することができる。

30

【0248】

その他の実施形態で、93870における遺伝子突然変異は、例えば2次元アレイや例えばチップ・ベースのアレイによって、DNAやRNAなどの対照核酸にサンプルをハイブリダイズすることにより確認できる。そのようなアレイは複数のアドレスを含み、そのそれぞれの位置は、互いに区別できるものである。複数のアドレスのそれぞれには、異なるプローブが位置付けられている。アレイは高密度のアドレスを有することができ、例えば何百、何千ものオリゴヌクレオチド・プローブを含むことができる(Cronin他(1996)Hum. Mutat. 7:244~255; Kozal他(1996)Nature Med. 2:753~759)。例えば、93870における遺伝子突然変異は、記載されている(前掲のCronin他)光生成DNAプローブを含む2次元アレイで各にすることができる。簡単に言うと、プローブの第1のハイブリダイゼーション・アレイを使用して、サンプルおよび対照中のDNAの長い伸長鎖全体をスキャンし、逐次オーバーラップするプローブの線形アレイを作製することによって配列間の塩基の変化を確認することができる。このステップにより、点突然変異の確認が可能になる。このステップの後、第2のハイブリダイゼーション・アレイを用い、検出される全ての変種または突然変異に相補的な、より小さい特殊なプローブ・アレイを使用することによって、特異的な突然変異の特徴付けを可能にする。各突然変異アレイは、平行なプローブの組からなり、一

40

50

方は野生型遺伝子に相補的であり他方は突然変異遺伝子に相補的である。

【0249】

さらに別の実施形態では、当技術分野で知られている様々な配列決定反応のいずれかを使用して、93870遺伝子を直接配列決定し、サンプル93870の配列と対応する野生型(対照)配列とを比較することによって突然変異を検出することができる。診断アッセイを実行する場合は(1995、*Biotechniques* 19:448)、質量分析法による配列決定を含めた自動化配列決定手順を利用することができる。

【0250】

93870遺伝子における突然変異を検出するためのその他の方法では、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ2重鎖での不適正塩基を検出するために、切断剤からの保護を行う方法を含む(Meyer他(1985)*Science* 230:1242; Cotton他(1988)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba他(1992)*Meth. Enzymol.* 217:286~295)。

10

【0251】

さらに別の実施形態で、不適正切断反応は、細胞サンプルから得られた93870cDNAの点突然変異を検出しマッピングするよう規定された系内で、2本鎖DNAの不適正塩基対を認識する1つまたは複数のタンパク質(いわゆる「DNA不適正修復」酵素)を使用する。例えば、*E. coli*のmutY酵素はG/A不適正でAを切断し、HeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼはG/T不適正でTを切断する(Hsu他(1994)*Carcinogenesis* 15:1657~1662; 米国特許第5,459,039号)。

20

【0252】

その他の実施形態では、93870遺伝子の突然変異を確認するために、電気泳動移動度の変化を使用することになる。例えば、突然変異体と野生型核酸との電気泳動移動度の差を検出するには、1本鎖高次構造多型(SSCP)を使用すればよい(Orita他(1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; Cotton(1993)*Mutat. Res.* 285:125~144; Hayashi(1992)*Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73~79)。サンプルおよび対照の93870核酸の1本鎖DNA断片は変性し、さらに復元される。1本鎖核酸の2次構造は配列によって様々であり、結果的に生じる電気泳動移動度の変化によって、単一の塩基の変化でさえ検出可能になる。DNA断片は、標識プローブで標識しまたは検出することができる。アッセイの選択性は、2次構造が配列の変化に対してより感受性の高いRNA(DNAではなく)を使用することによって、高めることができる。好ましい実施形態で、対象となる方法は、電気泳動移動度の変化に基づいて2本鎖のヘテロ2重鎖分子を分離するために、ヘテロ2重鎖分析を利用する(Keen他(1991)*Trends Genet.* 7:5)。

30

【0253】

さらに別の実施形態では、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲルでの突然変異体または野生型断片の移動に関し、変性剤勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイを行う(Myers他(1985)*Nature* 313:495)。DGGEを分析方法として使用する場合、例えばPCRにより約40塩基対の高融点GCリッチDNAのGCクランプを加えることによって、確実に完全に変性しないようDNAを修飾する。他の実施形態では、変性剤勾配の代わりに温度勾配を使用して、対照とサンプルのDNAの移動度の差を明らかにする(RosenbaumおよびReissner(1987)*Biophys. Chem.* 265:12753)。

40

【0254】

点突然変異を検出するためのその他の技法の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長法が含まれるが、これらに限定されない(Saiki他(1986)*Nature* 324:163; Saiki他(

50

1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。

【0255】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子に特異的な増幅技術を、本発明と併せて使用することができる。特異的な増幅に対するプライマーとして使用したオリゴヌクレオチドは、分子の中央(増幅がディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存するように; Gibbs他(1989) Nucl. Acids Res. 17:2437~2448)、または一方のプライマーの末端の3'-末端であって、適切な条件下、不適正によりポリメラーゼ伸長を防止または軽減することができる場所に(Prossner、1993、Tibtech 11:238)、問題の突然変異を持つことができる。さらに、切断をベースとした検出がなされるように、新規な制限部位を突然変異の領域に導入することが望ましいと考えられる(Gasparini他(1992) Mol. Cell Probes 6:1)。ある実施形態では、増幅用のTaqリガーゼを使用して増幅を行うことも考えられる(Barany、1991、Proc. Natl. Sci. USA 88:189)。そのような場合、5'-配列の3'-末端に完全な適正が存在する場合のみ連結反応が生じることになり、増幅の存否を探ることによって、特定の部位での既知の突然変異の存在を検出することが可能になる。

10

【0256】

本明細書で述べる方法は、例えば、本明細書で述べる少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含んだ事前にパックした診断用キットを使用することができ、これは例えば、93870遺伝子に関わる疾患または病気の徴候または家族歴を示す患者を診断する臨床の場で都合良く使用することができるものである。

20

【0257】

代替マーカーとしての93870分子の使用

本発明の93870分子は、障害または病態のマーカーとして、病態の前駆体に対するマーカーとして、病態の素因に対するマーカーとして、薬物活性のマーカーとして、または被験体の薬理ゲノム・プロフィルのマーカーとしても有用である。本明細書で述べる方法を使用して、本発明の93870分子の存否および/または量を検出することができ、生体内で1つまたは複数の生物学的状態と関連させることができる。例えば、本明細書の93870分子は、1つまたは複数の障害または病態あるいは病態をもたらす状態に対する代替マーカーとしての役割をすることができる。本明細書で使用する「代替マーカー」は、客観的な生化学的マーカーであり、疾病または障害の存否あるいは疾病または障害の進行(例えば腫瘍の存否)に相関するものである。そのようなマーカーの存在または量は疾病に応じて様々である。したがってこれらのマーカーは、特定の治療方針が病態または障害を軽減するのに効果的であるかどうかを示すのに役立つことができる。代替マーカーは、標準的な方法を用いて病態または障害の存在または程度を評価することが困難な場合(例えば早期の腫瘍)、または潜在的に危険な臨床上の最終点に至る前に、疾病の進行を評価することが望ましい場合(例えば、心筋梗塞または完全に発症したAIDSの望ましくない臨床結果が生じるよりもかなり前に、コレステロール・レベルを代替マーカーとして使用して心臓血管疾患の評価を行うことができ、HIV RNAレベルを代替マーカーと使用してHIV感染の分析を行うことができる)に、特に役立つものである。代替マーカーの使用の例が記載されている(例えば、Koomen他(2000) J. Mass. Spectrom. 35:258~264; James(1994) AIDS Treat. News Arch. 209)。

30

40

【0258】

本発明の93870分子は、薬力学マーカーとして使用することもできる。本明細書で使用する「薬力学マーカー」は、薬物効果に特に相関する客観的な生化学的マーカーである。薬力学マーカーの存在または量は、薬物が投与される病態または障害に関係せず、したがってマーカーの存在または量は、被験体内の薬物の存在または活性を示すものである。例えば薬力学マーカーは、薬物のレベルに関連してその組織内で発現したまたは転写されあるいは発現せず転写されないもので、そのマーカーは生体組織中の薬物の濃度を示すことが

50

できる。このように薬物の分布または吸収は、薬力学マーカーによってモニターすることができる。同様に、薬力学マーカーの存在または量は、薬物の代謝産物の存在または量に関係付けられ、その結果、マーカーの存在または量は、生体内での薬物の相対的な分解速度を示すことになる。薬力学マーカーは、特に薬物を低用量で投与した場合、薬物効果の検出感度を高めるのに特に役立つものである。少量の薬物であっても、マーカー（例えば93870マーカー）の転写および発現を複数回引き起こすのに十分であるので、増幅したマーカーは、薬物そのものよりもさらに容易に検出可能な量になる。またマーカーは、そのマーカー自体の性質に起因して、例えば本明細書で述べた方法を使用してより容易に検出することができ、93870タンパク質マーカーに対して免疫ベース検出システムで抗93870抗体を使用することができ、または93870 mRNAマーカーを検出するために、93870に特異的な放射性標識プローブを使用することができる。さらに、薬力学マーカーを使用することにより、可能な直接観察の範囲を超えて、薬物治療に起因するメカニズム・ベースの危険性の予測を行うことができる。薬力学マーカーの使用の例が記載されている（例えば米国特許第6,033,862号；Hattis他（1991）*Env. Health Perspect.* 90:229~238；Schentag（1999）*Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3:S21~S24；Nicolaou（1999）*Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3:S16~S20）。

10

【0259】

本発明の93870分子は、薬理ゲノム・マーカーとしても有用である。本明細書で使用する「薬理ゲノム・マーカー」は、被験体内での特異的な臨床薬物応答または感受性に相関する、客観的な生化学的マーカーである（例えば、McLeod他（1999）*Eur. J. Cancer* 35:1650~1652）。薬理ゲノム・マーカーの存在または量は、薬物投与前の、特定の薬物またはクラスの薬物に対して予測される、被験体の応答に関係する。被験体内の1つまたは複数の薬理ゲノム・マーカーの存在または量を評価することによって、その被験体に最も適切な薬物療法、または成功の度合いがより大きいと予測される薬物療法を選択することができる。例えば、被験体内での特定の腫瘍マーカーに対するRNAやタンパク質（例えば93870タンパク質またはRNA）の存在または量に基づいて、被験体内に存在し得る特定の腫瘍の治療に最適な、薬物または治療過程を選択することができる。同様に、93870 DNAにおける特定配列の突然変異の存否は、93870薬物応答に相関する。したがって薬理ゲノム・マーカーを使用することにより、治療を施す必要なく、各被験体ごとに最も適切な治療を適用することが可能になる。

20

30

【0260】

医薬組成物

本発明の核酸およびポリペプチド、その断片、ならびに抗93870抗体および93870の小分子モジュレーター（本明細書では「活性化合物とも呼ぶ」）は、医薬組成物に組み込むことができる。そのような組成物は、典型的な場合、核酸分子、タンパク質、または抗体および医薬品として許容される担体を含む。本明細書で使用する「医薬品として許容される担体」には、医薬品投与に適合する溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張性および吸収遅延剤などが含まれる。補足の活性化合物もこの組成物に組み入れることができる。

40

【0261】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するよう配合される。投与経路の例には、非経口投与、例えば静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば吸入）、経皮投与（局所的）、経粘膜投与、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分、すなわち注射用の水や生理食塩液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、その他の合成溶媒などの滅菌稀釈剤；ベンジルアルコールやメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸や亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート化剤；アセテートやシトレート、ホスフェートなどの緩衝液と、塩化ナトリウムやデキスト

50

ローズなど張度を調整する薬剤を含むことができる。pHは、塩酸や水酸化ナトリウムなど、酸または塩基で調整することができる。非経口製剤は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または多回用量バイアル内に包封することができる。

【0262】

注射可能な用途に適する医薬品組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液と、注射可能な滅菌溶液または分散液の直前調製用の滅菌粉末を含む。静脈内投与の場合、適切な担体は、生理食塩液、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parshippany、NJ）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は滅菌されていなければならない、容易に注射器に適用できる程度まで流体であるべきである。組成物は、製造および貯蔵条件下で安定であるべきであり、細菌や真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば水やエタノール、ポリオール（例えばグリセロールやプロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒でよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒径を維持することによって、また界面活性剤を使用することによって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベンやクロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって、行うことができる。多くの場合、組成物中に等張剤、例えば糖や、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の長時間にわたる吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

【0263】

滅菌注射溶液は、上述の成分の1種または組合せと共に適切な溶媒に必要とされる量の活性化化合物を混ぜ、その後、滅菌濾過することによって調製することができる。一般に分散液は、塩基性分散媒と上記のうち必要とされるその他の成分を含有する滅菌ビヒクルに活性化化合物を混ぜることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は真空乾燥および凍結乾燥であり、活性成分と、任意の追加の所望の成分であってその前もって滅菌濾過した溶液からのものを合わせた粉末が得られる。

【0264】

経口組成物は、一般に、不活性な稀釈剤または食べられる担体を含む。経口療法を施すために、活性化化合物を賦形剤と共に組み入れることができ、錠剤、トローチ、またはカプセル、例えばゼラチン・カプセルの形で使用される。経口組成物は、うがい薬として使用される流体担体を使用して調製することもできる。医薬品として相溶性のある結合剤および/または補助薬物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、下記の成分、すなわち微晶質セルロースやトラガントガム、ゼラチンなどの結合剤；デンプンやラクトースなどの賦形剤；アルギン酸やPrimogel（商標）、コーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムやSterotes（商標）などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースやサッカリンなどの甘味料；またはペパーミントやサリチル酸メチル、オレンジ・フレーバーなどの香料のいずれか、または同様の性質を持つ化合物のいずれかを含有することができる。

【0265】

吸入により投与する場合、化合物は、適切な噴射剤、例えば二酸化炭素などの気体が入っている加圧容器またはディスペンサー、あるいはネブライザーからエアロゾル・スプレイの形で送達される。

【0266】

全身投与も経粘膜または経皮手段によるものでよい。経粘膜または経皮投与では、浸透すべき障壁に適切な浸透剤を、配合物中に使用する。そのような浸透剤は、一般に当技術分野で知られており、例えば経粘膜投与では、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、点鼻スプレイまたは坐薬を使用することによって行うことができる。経皮投与では、一般に当技術分野で知られるように、活性化化合物を、軟膏、膏薬

、ゲル、またはクリームに配合する。

【0267】

直腸送達の場合、化合物は、坐薬（例えば、ココア・バターやその他のグリセリドなど従来の坐薬ベースと共に）または停留浣腸の形に調製することもできる。

【0268】

一実施形態で、活性化合物は、制御放出配合物など、体内から化合物が急速に排除されないよう保護する担体と共に調製し、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムが含まれる。エチレン酢酸ビニルやポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸など、生分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような配合物の調製方法は、当業者に明らかにされよう。これらの材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業上入手することもできる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に向けられたモノクローナル抗体を使用して感染細胞を標的としたリポソームを含む）も、医薬品として許容される担体として使用することができる。これらは、記述されている方法（例えば米国特許第4,522,811号）に従って調製することができる。

10

【0269】

経口または非経口組成物は、投与を容易にし用量を均一にするため、単回剤形で配合することが有利である。本明細書で使用する単回剤形は、治療する被験体に対する単回用量として適切な、物理的に分離した単位を指し、各単位は、必要とされる医薬品担体と共同して所望の治療効果が得られるよう計算された所定量の活性化合物を含有する。

20

【0270】

そのような化合物の毒性および治療効果は、細胞培養物または実験動物で、例えばLD₅₀（個体群の50%に致命的な用量）およびED₅₀（個体群の50%に治療上効果的な用量）を決定するための標準的な製薬手順によって決定することができる。毒性と治療の効果の用量比は治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒の副作用を示す化合物を使用することができるが、感染していない細胞に損傷が生じる可能性を最小限に抑えそれによって副作用を減少させるために、影響を受ける組織部位をそのような化合物で狙う送達システムを設計する際には、注意を払うべきである。

【0271】

細胞培養アッセイおよび動物での調査から得られたデータは、ヒトに使用される投薬量の範囲を策定するのに使用することができる。そのような化合物の投薬量は、毒性がわずかしかないか全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。投薬量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で様々に変えることができる。本発明の方法で使用される任意の化合物では、治療上有効な用量を、細胞培養アッセイから初めに推定することができる。用量は、動物モデルに合わせて策定され、それによって、細胞培養で決定されたIC₅₀（すなわち、最大症状の半分が阻害される試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現することができる。そのような情報は、ヒトに有用な用量をより正確に決定するのに使用することができる。血漿でのレベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィによって測定することができる。

30

40

【0272】

本明細書で定義される、治療上有効な量のタンパク質またはポリペプチド（すなわち有効投薬量）は、体重1キログラムあたり約0.001~30ミリグラム、好ましくは体重1キログラムあたり約0.01~25ミリグラム、より好ましくは体重1キログラムあたり約0.1~20ミリグラム、さらに好ましくは1キログラムあたり約1~10ミリグラム、1キログラムあたり2~9ミリグラム、1キログラムあたり3~8ミリグラム、1キログラムあたり4~7ミリグラム、または体重1キログラムあたり5~6ミリグラムに及ぶ。タンパク質またはポリペプチドは、約1~10週間の間、好ましくは2~8週間の間、より好ましくは約3~7週間の間、さらに好ましくは約4、5、または6週間の間、週あたり1回投与すればよい。当業者なら、疾病または障害の重篤さや前の治療、被験体の全

50

身の健康および/または年齢、その他の存在する疾病を含むがこれらに限定されないある要因が、被験体を効果的に治療するのに必要な投薬量およびタイミングに影響を及ぼす可能性があることを理解するであろう。さらに、治療上有効な量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体による被験体の治療には、1回の治療が含まれ、または好ましくは一連の治療が含まれる。

【0273】

抗体の場合、好ましい投薬量は、体重1キログラムあたり0.1ミリグラムである（一般に1キログラムあたり10～20ミリグラム）。抗体が脳内で作用する場合、1キログラムあたり50～100ミリグラムの投薬量が通常は適切である。一般に、部分ヒト抗体および完全ヒト抗体は、人体内での半減期がその他の抗体よりも長い。したがって投薬量を少なくし、投与する頻度を少なくすることも、しばしば可能である。抗体を安定化し、吸収および組織の浸透（例えば脳内へ）を高めるために、脂質化などの変性を使用することができる。抗体を脂質化するための方法は、Cruikshank他（1997）J. A. I. D. S. Hum. Retrovir. 14: 193に記載されている。

10

【0274】

本発明は、発現または活性をモジュレートする薬剤を包含する。薬剤は、例えば小分子でよい。例えばそのような小分子には、ペプチド、ペプチド模擬体（例えばペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、分子量がモルあたり約10,000グラム未満の有機または無機化合物（すなわちヘテロ有機および有機金属化合物を含む）、分子量がモルあたり約5,000グラム未満の有機または無機化合物、分子量がモルあたり約1,000グラム未満の有機または無機化合物、およびこれらの塩、エステル、およびその他の医薬品として許容される形のものが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0275】

例示的な用量には、被験体またはサンプルの重量1キログラムあたり小分子がミリグラムまたはマイクログラム単位の量のもが含まれる（例えばキログラムあたり約1マイクログラムからキログラムあたり約500ミリグラム、キログラムあたり約100マイクログラムからキログラムあたり約5ミリグラム、またはキログラムあたり約1マイクログラムからキログラムあたり約50ミリグラム）。小分子の適切な用量は、モジュレートされる発現または活性に対する小分子の効力に応じて変化することが、さらに理解される。本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性をモジュレートするために、これら小分子の1つまたは複数を動物（例えばヒト）に投与する場合、例えば医師、獣医師、または研究者は初めに比較的低い用量を処方して、その後、適切な応答が得られるまで用量を増やすことができる。さらに、任意の特定の動物被験体に対する特定の用量レベルは、使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、体重、全身の健康、性別、および食餌、投与時間、投与経路、排出速度、任意の薬物の組合せ、モジュレートされる発現または活性の程度を含めた様々な要因に応じて変わることが理解される。

30

【0276】

抗体（またはその断片）は、細胞毒や治療薬、放射性金属イオンなどの治療部分に接合することができる。細胞毒または細胞毒性の薬剤は、細胞に有害な何らかの薬剤を含む。その例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルチシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパノール、およびプロマイシン、およびこれらの類似体または同族体が含まれる。治療薬には、代謝拮抗物質（例えばメトトレキセートや6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミンやチオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（C

40

50

CNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、cis-ジクロロジアミン白金(II)DDPCシスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(以前はダウノマイシン)やドキソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)やブレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン(AMC))、抗有糸分裂薬(例えばピンクリスチンやピンブラスチン)が含まれるがこれらに限定されない。

【0277】

本発明の接合体は、所与の生物学的応答を変更するために使用することができ、その薬物部分は、従来からの化学的治療薬に限定されると解釈するものではない。例えば薬物部分は、所望の生体活性を有するタンパク質またはポリペプチドでよい。そのようなタンパク質には、例えば、アブリンやリシンA、ゲロニン、シュードモナス属の外毒素、ジフテリア毒素などの毒素；腫瘍壊死因子やインターフェロン、インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン賦活剤などのタンパク質；または例えばリンホカインやインターロイキン-1、-2、および-6、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、その他の増殖因子などの生物学的応答調節剤が含まれる。

10

【0278】

あるいは抗体を第2の抗体に接合して、米国特許第4,676,980号でSegalにより記述される抗体ヘテロ接合体を形成することができる。

【0279】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入することができ、遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈内注射や局所投与(米国特許第5,328,470号)によって、または定位注入(例えばChen他(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054~3057)によって、被験体に送達することができる。遺伝子治療ベクターの医薬品調剤は、許容される稀釈剤に遺伝子治療ベクターを含むことができ、または遺伝子送達ビークルが埋め込まれた遅効性マトリックスを含むことができる。あるいは、レトロウイルスベクターなど組換え細胞から無傷の状態ですべての遺伝子送達ベクターを生成することができる場合、その医薬品調剤は、遺伝子送達系を生成する1つまたは複数の細胞を含むことができる。

20

【0280】

医薬組成物は、投与のための取扱説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

30

【0281】

治療方法

本発明は、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に関連する障害の危険性があり(または障害を受け易く)またはそのような障害を持つ被験体を治療するための、予防方法および治療方法の両方を提供する。予防的治療法および実際に治すための治療法の両方に関し、そのような治療は、薬理ゲノム学の分野から得られた知識に基づいて特異的に調整または修正することができる。本明細書で使用する「薬理ゲノム学」は、臨床開発中の薬物および市場に出ている薬物に、遺伝子配列決定や統計遺伝学、遺伝子発現分析などのゲノム技術を利用することを指す。より具体的にはこの用語は、患者の遺伝子が、薬物に対するその患者の応答をどのように決定するかという研究を指す(例えば患者の「薬物応答表現型」や「薬物応答遺伝子型」)。したがって本発明の別の態様は、本発明の93870分子または93870モジュレーターによる個体の予防的または治療的療法を、個体の薬物応答遺伝子型に合わせて調整するための方法を提供する。

40

【0282】

治療は、疾病、疾病の症状、または疾病に対する素因の治療、治癒、緩和、軽減、変化、矯正、改善、改良、または影響を及ぼす目的で、疾病、疾病の徴候、または疾病に対する素因を有する患者への治療薬の施用または投与と定義され、あるいはそのような患者から単離した組織または細胞系への治療薬の施用または投与と定義される。

50

【0283】

治療薬には、小分子、ペプチド、抗体、リボザイム、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれるがこれらに限定されない。

【0284】

薬理ゲノム学によって、臨床医または医師は、予防的または治療的療法から最も利益を得る患者にその療法を合わせることが可能になり、毒性薬物に関連した副作用を引き起こす患者の治療を避けることが可能になる。

【0285】

一実施形態で、本発明は、異常なまたは望ましくない93870発現または活性に関連した被験体の疾病または状態を、その被験体に93870あるいは93870発現または少なくとも1つの93870活性をモジュレートする薬剤を投与することによって防止するための方法を提供する。異常なまたは望ましくない93870発現または活性によって引き起こされあるいはそのような発現または活性に寄与する疾病の危険性がある被験体は、例えば本明細書で述べる診断または予後アッセイのいずれかまたはそれらの組合せによって特定することができる。予防薬の投与は、93870異常の特性を示す徴候発現の前に行うことができ、その結果、疾病または障害が予防され、あるいはその進行が遅くなる。93870異常のタイプに応じ、被験体の治療をするために例えば93870作動薬や93870拮抗薬を使用することができる。適切な薬剤は、本明細書で述べるスクリーニング・アッセイに基づいて決定することができる。

10

【0286】

一部の93870障害は、少なくとも部分的に、異常レベルの遺伝子産物によってまたは異常活性を示す遺伝子産物の存在によって、引き起こされる可能性がある。したがって、そのような遺伝子産物のレベルおよび/または活性の低下により、障害症状が改善されると考えられる。

20

【0287】

論じたように、首尾よく行われる93870障害の治療は、標的遺伝子産物の発現または活性を阻害するのに役立つ技法によってもたらされる。例えば上述のアッセイを使用して特定された、負のモジュレーション活性を示すことが明らかにされた化合物は、93870障害の徴候を予防しかつ/または改善するために本発明にしたがって使用することができる。そのような分子には、ペプチド、ホスホペプチド、小有機または無機分子、または抗体（例えばポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、抗イディオタイプ、キメラまたは1本鎖抗体、およびFab、F(ab')₂およびFab発現ライブラリー断片、scFV分子、およびこれらのエピトープ結合断片を含む）を含めることができるがこれらに限定されない。

30

【0288】

さらに、標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンスおよびリボザイム分子も、標的遺伝子発現のレベルを低下させるために本発明にしたがって使用することができ、したがって標的遺伝子活性のレベルが効果的に低下する。さらに、標的遺伝子活性のレベルを低下させるため、3重らせん分子を利用することができる。アンチセンス、リボザイム、および3重らせん分子は既に述べたものである。

40

【0289】

突然変異遺伝子発現を減少させまたは阻害するためにアンチセンス、リボザイム、および/または3重らせん分子を使用することによって、正常な標的遺伝子の対立遺伝子によって生成されたRNAの転写（3重らせん）および/または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を減少させまたは阻害することも可能であり、その結果、存在する正常な標的遺伝子産物の濃度を、正常な表現型に必要とされるよりも下げることができる。そのような場合、正常な標的遺伝子活性を示す標的遺伝子ポリペプチドをコードし発現する核酸分子を、遺伝子治療法によって細胞に導入することができる。あるいは、標的遺伝子が細胞外タンパク質をコードする場合、細胞または組織の標的遺伝子活性の必須レベルを維持するために、正常な標的遺伝子タンパク質をその細胞または組織に同時投与することが好ましいと

50

考えられる。

【0290】

93870発現を特徴とする疾病を治療または予防する際に核酸分子を利用することができる別の方法は、93870タンパク質に特異的なアプタマー分子を使用することである。アプタマーは、タンパク質のリガンドに特異的に結合させる3次構造を有する核酸分子である(例えばOsborne他(1997)Curr. Opin. Chem. Biol. 1:5~9; Patel(1997)Curr. Opin. Chem. Biol. 1:32~46)。核酸分子は多くの場合、治療用タンパク質分子を用いる場合よりも都合良く標的細胞に導入することができるので、アプタマーは、多分化効果を発揮することができる薬物またはその他の分子を導入せずに93870タンパク質活性を特に低下させることができる方法を提供する。 10

【0291】

標的遺伝子産物に特異的でありかつ標的遺伝子産物の活性を低下させる抗体を生成することができる。したがってそのような抗体は、93870障害の治療に負のモジュレーション技法が適切である場合に投与することができる。

【0292】

抗体産生を刺激するために93870タンパク質またはエピトープを動物またはヒト被験体に注射することがその被験体に有害である場合、抗イディオタイプ抗体を使用することによって、93870に対する免疫応答を生成することが可能である(例えばHerlynn(1999)Ann. Med. 31:66~78; Bhattacharya-Chatterjee他(1998)Cancer Treat. Res. 94:51~68)。抗イディオタイプ抗体を哺乳動物またはヒト被験体に導入する場合、93870タンパク質に特異的であるべき抗イディオタイプ抗体の産生を刺激すべきである。93870発現を特徴とする疾病を対象としたワクチンも、このように生成することができる。 20

【0293】

標的抗原が細胞内であり全抗体を使用する場合、抗体を内在化することが好ましいと考えられる。細胞内に、標的抗原に結合する抗体またはFab領域の断片を送達するには、リポフェクションまたはリポソームを使用することができる。抗体の断片を使用する場合は、標的抗原に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体のFv領域に対応するアミノ酸配列を有するペプチドを使用することができる。あるいは、細胞内標的抗原に結合する1本鎖中和抗体を投与することもできる。そのような1本鎖抗体は、例えば標的細胞群内で1本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現させることによって投与することができる(例えばMarasco他(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889~7893)。 30

【0294】

標的遺伝子の発現、合成、および/または活性を阻害する特定された化合物は、GPCR障害を予防し、治療し、または改善するために治療上有効な用量で患者に投与することができる。治療上有効な用量は、障害の徴候の改善をもたらすのに十分な化合物の量を指す。

【0295】

そのような化合物の毒性および治療効果は、細胞培養物または実験動物で、例えばLD₅₀(個体群の50%に致命的な用量)およびED₅₀(個体群の50%に治療上効果的な用量)を決定するための標準的な製薬手順によって決定することができる。毒および治療の効果の用量比は治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀で表すことができる。大きい治療指数を示す化合物が好ましい。毒の副作用を示す化合物を使用することができるが、感染していない細胞に損傷が生じる可能性を最小限に抑えそれによって副作用を減少させるために、影響を受ける組織部位をそのような化合物で狙う送達システムを設計する際には、注意を払うべきである。 40

【0296】

細胞培養アッセイおよび動物での調査から得られたデータは、ヒトに使用される投薬量の 50

範囲を策定するのに使用することができる。そのような化合物の投薬量は、毒性がわずかしかなく全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内であることが好ましい。投薬量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で様々に変えることができる。本発明の方法で使用される任意の化合物では、治療上有効な用量を、細胞培養アッセイから初めに推定することができる。用量は、動物モデルに合わせて策定され、それによって、細胞培養で決定されたIC₅₀（すなわち、最大徴候の半分が阻害される試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を実現することができる。そのような情報は、ヒトに有用な用量をより正確に決定するのに使用することができる。血漿でのレベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィによって測定することができる。

【0297】

個体に有効な用量を決定する別の例は、試験対象の血清中の「フリー（free）な」および「結合した」化合物のレベルを直接アッセイする能力である。そのようなアッセイは、分子インプリンティング技法によって生成された抗体類似体および/または「バイオセンサー」を利用することができる。93870活性をモジュレートすることができる化合物を鋳型または「インプリンティング分子」として使用して、触媒試薬による重合を行う前に重合性モノマーを空間的に組織化する。インプリントされた分子をその後除去することによって、化合物の反復「陰画」を含むポリマー・マトリックスが残り、その分子を生物学的アッセイ条件下で選択的に再結合することができる。この技法の詳細な内容は、当技術分野で明らかにされている（Ansell他（1996）Curr. Opin. Biotechnol. 7: 89~94; Shea（1994）Trends Polym. Sci. 2: 166~173）。そのような「インプリント」アフィニティ・マトリックスは、リガンド結合アッセイに適しており、固定化したモノクローナル抗体成分の代わりに適切にインプリントしたマトリックスが用いられる（例えば、Vlatakis他（1993）Nature 361: 645~647に記載されているマトリックス）。同位体標識を使用することによって、93870の発現または活性をモジュレートする化合物の「フリー」濃度を容易にモニターすることができ、IC₅₀の計算に使用することができる。

【0298】

そのような「インプリント」アフィニティ・マトリックスは、標的化合物の局所的および選択的結合によってその光子放出特性が測定可能に変化する蛍光基を含むよう、設計することもできる。このような変化は、適切な光ファイバー機器を使用して実時間で容易にアッセイにかけることができ、試験対象における用量を、その個体のIC₅₀に基づいて素早く最適化することが可能になる。そのような「バイオセンサー」の初歩的な例が、Kriz他（1995）Anal. Chem. 67: 2142~2144で論じられている。

【0299】

本発明の別の態様は、治療を目的として93870発現または活性をモジュレートする方法に関する。したがって例示的な実施形態で、本発明のモジュレーション方法は、細胞を、その細胞に関連する93870タンパク質活性の活性の1つまたは複数をモジュレートする93870または薬剤に接触させることを含む。93870タンパク質活性をモジュレートする薬剤は、核酸またはタンパク質、93870タンパク質の自然に生ずる標的分子（例えば93870基質または受容体）、93870抗体、93870作動薬または拮抗薬、93870作動薬または拮抗薬のペプチド模擬体、またはその他の小分子など、本明細書で述べた薬剤でよい。

【0300】

一実施形態で、薬剤は1つまたは複数の93870活性を刺激する。そのような刺激性のある薬剤の例には、活性93870タンパク質と93870をコードする核酸分子が含まれる。別の実施形態で、薬剤は1つまたは複数の93870活性を阻害する。そのような阻害剤の例には、アンチセンス93870核酸分子、抗93870抗体、および93870阻害剤が含まれる。これらのモジュレーション方法は、生体外で（例えば薬剤と共に細胞を培養することによって）、あるいは生体内で（例えば被験体に薬剤を投与することに

10

20

30

40

50

よって)行うことができる。したがって本発明は、93870タンパク質または核酸分子の異常なまたは望ましくない発現または活性を特徴とする疾病または障害に罹っている個体の治療方法を提供する。一実施形態で、この方法は、93870発現または活性をモジュレート(例えばアップレギュレーションやダウンレギュレーション)する薬剤(例えば本明細書で述べたスクリーニング・アッセイによって特定された薬剤)または薬剤の組合せを投与することを含む。別の実施形態で、この方法は、低下し異常でありまたは望ましくない93870発現または活性を補償する治療として、93870タンパク質または核酸分子を投与することを含む。

【0301】

93870活性の刺激は、93870が異常にダウンレギュレートされかつ/または93870活性が増すことによって有益な効果を及ぼす可能性がある状態で望ましい。例えば、93870活性の刺激は、93870がダウンレギュレートされかつ/または93870活性が増すことによって有益な効果を及ぼす可能性がある状態で望ましい。同様に、93870活性の阻害は、93870が異常にアップレギュレートされかつ/または93870活性の低下によって有益な効果を及ぼす可能性がある状態で望ましい。

【0302】

93870分子は、上述の免疫および炎症性障害、血小板障害、骨格または骨代謝障害、骨髄単核細胞障害、ならびに以下に述べる細胞増殖および/または分化障害、ホルモン障害、神経障害、心臓血管障害、血管障害、ウイルス性疾患、肝臓障害、疼痛および代謝障害の1つまたは複数を制御するための新規な診断標的および治療標的として働くことができる。

【0303】

細胞増殖および/または分化障害の例には、癌、例えば癌腫、肉腫、転移性障害、または造血腫瘍障害、例えば白血病が含まれる。転移性腫瘍は、前立腺、結腸、肺、乳房、および肝臓由来のものも含むがこれらに限定されない多数の原発腫瘍タイプから生じる可能性がある。

【0304】

本明細書で使用する「癌」という用語(「過剰増殖」および「腫瘍性」という用語とも同義で使用される)は、自律的増殖能力を有する細胞を指し、すなわち細胞増殖が急速に広がることを特徴とする異常な状況または状態を指す。癌性疾患状態は、病的な状態、すなわち疾患状態を特徴付けまたは構成する状態、例えば悪性腫瘍増殖として分類することができ、あるいは非病的な状態、すなわち正常な状態とは言えないが疾患状態に関連しているわけではない状態、例えば創傷治癒に伴う細胞増殖などとして分類することができる。この用語は、組織病理学的なタイプまたは侵入期に関係なく、全てのタイプの癌性増殖または発癌プロセス、転移組織または悪性変換細胞、組織、または器官を含むものとする。「癌」という用語は、肺、乳房、甲状腺、リンパ球、胃腸、尿生殖路などに影響を及ぼすような様々な器官系の悪性腫瘍、ならびに最頻結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌および/または睾丸腫瘍、肺の非小細胞癌、小腸の癌、および食道の癌などの悪性腫瘍を含む腺癌を含む。「癌腫」という用語は当技術分野で理解されており、呼吸器系癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖系癌腫、睾丸癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌腫、およびメラノーマを含む上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を指す。例示的な癌腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭部、首、結腸、および卵巣の組織から形成するものが含まれる。「癌腫」という用語は、例えば癌性および肉腫性の組織からなる悪性腫瘍を含んだ癌肉腫も含む。「腺癌」は、腺組織から誘発された癌腫、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫を指す。「肉腫」という用語は当技術分野で理解されており、間葉由来の悪性腫瘍を指す。

【0305】

本発明の93870分子は、様々な増殖障害をモニターし、治療し、かつ/または診断するために使用することができる。そのような障害は、造血腫瘍障害を含む。本明細書で使用する「造血腫瘍障害」という用語は、造血由来の増殖性/腫瘍性細胞に関わる疾病であって、例えば骨髄性、リンパ球様、または赤血球系列、またはこれらの前駆細胞から生じ

るものを含む。典型的な場合、これらの疾病は、分化が不十分な急性白血病、例えば赤血球性白血病や急性巨核球性白血病から生じる。さらに例示的な骨髄性障害には、急性前骨髄球白血病 (APML)、急性骨髄性白血病 (AML)、および慢性骨髄性白血病 (CML) (Vaickus, L. (1991) Crit. Rev. in Oncol. / Hemotol. 11: 267~97) 含まれるがこれらに限定されず、リンパ球悪性腫瘍には、B-lineage ALLおよびT-lineage ALLを含む急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病 (PLL)、ヘアリーセル白血病 (HLL)、およびワルデンストレーム大グロブリン血症 (WM) が含まれるがこれらに限定されない。悪性リンパ腫の追加の形態には、非ホジキンリンパ腫およびその変種、末梢T細胞性リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATL)、皮膚T細胞リンパ腫 (CTCL)、大型顆粒リンパ性白血病 (LGF)、ホジキン病、およびリード-ステンベルグ病が含まれるがこれらに限定されない。

10

【0306】

GPCR関連障害には、生体内でのホルモンの産生および/または調節が異常な状態や疾病などのホルモン障害を含めることができる。そのような障害および疾病の例には、I型およびII型糖尿病、脳下垂体障害 (例えば成長異常)、甲状腺障害 (例えば甲状腺機能低下症や甲状腺機能亢進症)、および生殖または妊孕障害 (例えば、前立腺や子宮、膣などの生殖系器官に影響を及ぼす障害; 被験体内での生殖ホルモンのレベルの平衡異常に関する障害; 被験体が生殖する能力に影響を及ぼす障害; 第2次性徴の発現に影響を及ぼす障害、例えば副腎過形成) が含まれる。

20

【0307】

さらにGPCRに関連する障害は、神経障害である。そのような神経障害には、例えばニューロンに関わる障害と、神経膠星状細胞や乏突起神経膠細胞、脳室上衣細胞などのグリアに関わる障害; 脳水腫、頭蓋内圧上昇およびヘルニア形成、および水頭症; 神経管奇形や前脳奇形、後頭蓋窩奇形、脊髄空洞症および水脊髄症などの外表奇形および発育異常; 周産期脳損傷; 脳血管障害、例えば低酸素症や虚血、梗塞形成に関するものであり、低血圧症、低灌流、および低流量状態 - 全脳虚血および限局性脳虚血 梗塞形成であって局所血液供給の閉塞からのものを含み、頭蓋内出血であって、脳内 (実質内) 出血、クモ膜下出血、およびイチゴ状動脈瘤破裂を含み、血管奇形、高血圧性脳血管障害であって、裂孔梗塞、スリット出血、高血圧性脳症を含むもの; 感染、例えば急性髄膜炎であって、急性化膿 (細菌性) 髄膜炎および急性無菌 (ウイルス性) 髄膜炎を含み、急性限局性化膿性感染であって、脳膿瘍、硬膜下蓄膿、および硬膜外膿瘍を含み、慢性細菌性髄膜炎であって、結核およびミコプラズマ症、神経梅毒、および神経ボレリア症 (ライム病) を含み、ウイルス性髄膜炎であって、アルボ媒介性 (アルボ) ウイルス脳炎、単純疱疹ウイルス1型、単純疱疹ウイルス2型、水痘-帯状疱疹ウイルス (帯状疱疹)、サイトメガロウイルス、ポリオ、狂犬病を含み、ヒト免疫不全ウイルス1型であって、HIV-1 髄膜炎 (亜急性脳炎)、空胞性ミエロパシー、AIDS 随伴ミエロパシー、末梢神経疾患、子供のAIDS、進行性多巣性白質脳症、亜急性硬化性全脳炎、真菌性髄膜炎、その他の感染性神経系疾患を含むもの; 伝染性海綿状脳症 (プリオン病); 脱髄疾患であって、多発性硬化症、多発性硬化症変種、急性散在性脳脊髄炎、および急性壊死性出血性脳炎、およびその他の脱髄疾患を含むもの; 消耗性疾患、例えば大脳皮質に影響を及ぼす消耗性疾患であって、アルツハイマー病およびピック病であり、脳幹神経節および脳幹の消耗性疾患であって、パーキンソン症候群、特発性パーキンソン病 (振戦麻痺)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変形症を含み、多発性萎縮症であって、線条体黒質変性、シャイ-ドレーガー症候群、オリブ橋小脳萎縮症、およびハンチントン病を含むもの; 脊髄小脳変性症であって、脊髄脳症失調を含み、フリードライヒ失調症、および毛細血管拡張性運動失調、運動ニューロンに影響を及ぼす消耗性疾患であって、筋萎縮性側索硬化症 (運動ニューロン疾患)、延髄脊髄萎縮症、および棘筋萎縮症を含むもの; 先天性代謝異常、例えば白質萎縮症であって、クラッペ病、変染色性白質ジストロフィー、副腎白質ジストロフィー、ペリツェウス-メルバッハー病、およびキャナヴァン病を含み、ミトコンドリア脳筋

30

40

50

症であって、リー病およびその他のミトコンドリア脳筋症を含むもの；毒性および後天性代謝異常であって、チアミン（ビタミンB₁）欠乏症やビタミンB₁₂欠乏症などのビタミン欠乏症を含み、代謝障害の神経後遺症であって、低血糖症、高血糖症、および肝性脳症を含み、中毒障害であって、一酸化炭素、メタノール、エタノールを含み、放射であって、メトトレキサートおよび放射の組合せで誘発された損傷を含むもの；腫瘍、例えばグリオームであって、神経膠星状細胞腫を含み、原線維性（拡散）星状細胞腫および多形性神経膠芽腫、毛様細胞性星状細胞腫、多形性黄色星状膠細胞腫、および脳幹神経膠腫、オリゴデンドログリオーム、および脳質上衣細胞腫および関連する傍室塊病変、ニューロン腫瘍を含み、低分化新生物であって、髄芽細胞腫を含み、その他の実質性腫瘍であって、原発性脳リンパ腫、胚細胞腫瘍、および松果体実質性腫瘍、髄膜腫、転移性腫瘍、経産婦腫瘍性症状を含み、末梢神経鞘腫瘍であって、神経鞘腫、神経線維腫、および悪性末梢神経鞘腫瘍（悪性神経鞘腫）を含み、神経皮膚症候群（母斑症）であって、神経線維腫症を含み、1型神経線維腫症（NF1）および2型神経線維腫症（NF2）、結節硬化症、およびフォンヒッペル-リンドウ病を含むものなどが含まれる。

10

【0308】

心臓血管障害には、心臓肥大症、左心不全、および右心不全を含むがこれらに限定されない心不全；狭心症、心筋梗塞、慢性虚血性心疾患、および突発性心臓病を含むがこれらに限定されない虚血性心疾患；全身性（左側）高血圧性心疾患および肺性（右側）高血圧性心疾患を含むがこれらに限定されない高血圧性心疾患；先天性2尖大動脈弁石灰化や僧帽弁輪石灰化などの石灰化によって引き起こされる弁膜変性および僧帽弁の粘液性退行変性（僧帽弁脱出）、リウマチ熱およびリウマチ性心疾患、感染性心内膜炎、非細菌性血栓性心内膜炎や紅斑性狼痕の心内膜炎（リプマン-サックス病）などの非感染性増殖、カルチノイド心疾患、人工弁の合併症を含むがこれらに限定されない弁膜性心疾患；拡張型心筋症、肥大性心筋症、収縮性心筋症、および心筋炎を含むがこれらに限定されない心筋疾患；心外膜液および心膜血症を含むがこれらに限定されない心膜疾患、急性心膜炎および治癒心膜炎を含む心膜炎、およびリウマチ性心疾患；粘液腫や脂肪腫、乳頭弾性線維腫、横紋筋腫、肉腫などの原発性心臓病を含むがこれらに限定されない腫瘍性心疾患、および非心臓腫瘍の心作用；左右短絡-後期チアノーゼであって、心房中隔欠損、心室中隔欠損、動脈管開存、房室中隔欠損など、右左短絡-初期チアノーゼであって、ファロー4徴、大血管転位、動脈幹、3尖弁閉鎖、総肺静脈還流異常など、閉塞性先天性異常であって、大動脈縮窄、肺動脈弁狭窄および閉鎖、大動脈弁狭窄および閉鎖など、心臓移植に伴う障害、およびうっ血性心不全を含むがこれらに限定されない先天性心疾患が含まれるがこれらに限定されない。

20

30

【0309】

血管に関わる障害には、内皮機能不全や内皮活性、内膜肥厚などの損傷に対する血管細胞壁の応答；動静脈瘻やアテローム性動脈硬化症、高血圧性血管疾患、例えば高血圧症などの先天性異常が含まれるがこれらに限定されない血管疾患；炎症性疾患-脈管炎であって、例えば巨細胞性（側頭）動脈炎や高安動脈炎、結節性多発性動脈炎（古典的）、川崎症候群（粘膜皮膚リンパ節症候群）、顕微鏡的多発性血管炎（顕微鏡的多発性動脈炎、過敏症または白血球破碎性血管炎）、ヴェグナー肉芽腫症、閉塞性血栓性血管炎（バージャー病）、その他の障害に伴う脈管炎、感染性動脈炎など；レイノー病；腹部大動脈瘤や梅毒性（luetitc）動脈瘤、大動脈解離などの動脈瘤および解離；静脈瘤や血栓性静脈炎および静脈血栓症、上大静脈（上大静脈症候群）、下大静脈閉塞（下大静脈症候群）、リンパ管炎など、静脈およびリンパ管の障害；血管腫、リンパ管腫、グロムス腫瘍（グロムス血管腫）、血管拡張症、細菌性血管腫症など、良性腫瘍および腫瘍のような状態を含む腫瘍、カポジ肉腫や血管内皮腫などの中程度（境界領域低級悪性腫瘍）腫瘍、血管肉腫や血管外皮細胞腫などの悪性腫瘍；バルーン血管形成術および関連する技法や血管置換などであって、大動脈冠動脈バイパス移植術など、血管疾患における治療的介入の病状が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0310】

50

さらに93870分子は、B型肝炎、C型肝炎、および単純疱疹ウイルス(HSV)を含むがこれらに限定されないあるウイルス病(例えば肝疾患)の病因学において、重要な役割を果たすことができる。93870活性のモジュレーターは、ウイルス病を制御するのに使用することができる。例えば93870分子は、ウイルス感染に重要なウイルス性プロテアーゼ活性を媒介する際に、ある役割を果たすことができる。モジュレーターは、ウイルスに感染した組織またはウイルス関連の組織線維症、特に肝臓および肝線維症の治療および/または診断で使用することができる。また93870モジュレーターは、ウイルス関連の癌腫、特に肝細胞癌の治療および/または診断にも使用することができる。

【0311】

本明細書で述べる方法によって治療または診断することができる肝障害には、前から存在する線維の崩壊および凝縮を伴う細胞外マトリックスの産生と分解の平衡異常から生ずるものなど、肝臓内での線維組織の蓄積に伴う障害が含まれるが、これらに限定されない。本明細書で述べる方法は、炎症性プロセスや、毒による損傷または肝血流量が変化したことによる組織損傷、感染(例えば細菌やウイルス、寄生虫)など、ホメオスタシスを妨げるプロセスを含めた広く様々な薬剤によって引き起こされた肝細胞壊死または損傷の診断または治療に使用することができる。例えばこの方法は、門脈圧亢進症や肝線維症など、肝損傷の早期検出に使用することができる。さらにこの方法は、先天性代謝異常に起因する肝線維症、例えばゴーシェ病(脂質異常)やグリコーゲン貯蔵障害、A1アンチトリプシン欠損症などの蓄積障害; 外因性物質の蓄積(例えば貯蔵)を媒介する障害であって、例えばヘモクロマトーシス(鉄過剰症候群)や銅蓄積症(ウィルソン病)、毒素代謝産物の蓄積をもたらす障害(例えばチロシン血症、果糖血症、ガラクトース血症)、およびペルオキシソーム障害(例えばツェルベーター症候群)から生ずる線維症を検出するのに使用することができる。さらに、本明細書で述べた方法は、例えばメトトレキサートやイソニザイド、オキシフェニサチン、メチルドーパ、クロルプロマジン、トルブタミド、アルコールなど、様々な化学物質または薬物の投与に関連した肝損傷であって、肝臓内または肝臓外胆汁流の閉塞や肝循環の変化、例えば慢性心不全や静脈閉塞症、門脈血栓症、パッド-キアリ症候群から生じるものなど、血管障害の肝発現を示す肝損傷の、早期検出および治療に有用と考えられる。

【0312】

あるいは93870は、代謝または疼痛障害を調節する際に重要な役割を果たすことができる。代謝平衡異常の疾病には、肥満症、神経性食欲不振、過食症、悪液質、脂質障害、および糖尿病が含まれるがこれらに限定されない。疼痛障害の例には、様々な形態の組織損傷中に引き起こされる疼痛応答、例えば炎症や感染、虚血であって、通常は痛覚過敏と呼ばれるもの(例えばFields, H.L. (1987) Pain, New York: McGraw-Hillに記載されている); 筋骨格障害に伴う疼痛、例えば関節痛; 歯痛; 頭痛; 手術に伴う疼痛; 過敏性腸症候群に関する疼痛; 胸痛が含まれるが、これらに限定されない。

【0313】

薬理ゲノム学

本発明の93870分子、ならびに薬剤、またはモジュレーターであって、本発明で述べたスクリーニング・アッセイによって明らかにされた93870活性(例えば93870遺伝子発現)に対する刺激または阻害作用を有するものを個体に投与して、異常なまたは望ましくない93870活性に関連した93870関連障害(例えば造血に伴う障害および免疫障害)の療法(予防的または治療的)を施すことができる。そのような療法と併せて、薬理ゲノム学(すなわち個体の遺伝子型と、外来化合物または薬物に対する個体の応答との関係に関する研究)も考慮に入れることができる。治療の代謝の差は、薬理学上活性な薬物の用量と血液濃度との関係を変えることによって、重篤な毒性または治療の失敗につながる可能性がある。したがって医師または臨床医は、93870分子または93870モジュレーターを投与すべきか否か決定すると共に、93870分子または93870モジュレーターによる療法での投薬量および/または治療プログラムを調整する際に、

関連ある薬理ゲノム学研究で得られた知識の利用を考慮に入れることができる。

【0314】

薬理ゲノム学は、罹患した人物の薬物素因の変化および異常動作に起因する、薬物に対する応答の臨床上有意な遺伝的ばらつきを取り扱う（例えばEichelbaum他（1996）Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23: 983~985; Linder他（1997）Clin. Chem. 43: 254~266）。一般に、2つのタイプの薬理遺伝的状态を区別することができる。薬物が身体に作用する方法を変化させる、単一因子として伝えられた遺伝的状态（変化した薬物動作）、または身体が薬物に作用する方法を変化させる、単一因子として伝えられた遺伝的状态（変化した薬物代謝）である。これらの薬理遺伝的状态は、まれな遺伝子欠損として、または天然に生じる多型として生じる。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損（G6PD）は一般的遺伝性酵素病であり、主な臨床上の合併症は、酸化剤（抗マラリア、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）摂取後およびソラマメ消費後の溶血である。

10

【0315】

「ゲノムワイド関連」と呼ばれる、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための1つの薬理ゲノム学的手法は、主に、既に知られている遺伝子関連マーカーからなるヒトゲノムの高分解能マップを利用する（例えば「重対立遺伝子」遺伝子マーカー・マップであって、ヒトゲノム上の60,000~100,000多型または可変部位からなり、そのそれぞれが2つの変種を有する）。そのような高分解能遺伝子マップは、特に観察される薬物応答または副作用に関連するマーカーを同定するために第II/III相薬物試験に参加している統計上有意な数の患者それぞれのゲノムのマップと比較することができる。あるいはそのような高分解能マップは、ヒトゲノムにおける数千万の既知の単一ヌクレオチド多型（SNP）の組合せから生成することができる。本明細書で使用する「SNP」は、DNAの伸長部の単一ヌクレオチド塩基で生じる一般的な変形である。例えばSNPは、DNA 100塩基ごとに1回生じると考えられる。SNPは疾病プロセスに関与可能であるが、大多数は疾病に関連していない。そのようなSNPの出現に基づいて遺伝子マップが与えられると、個々のゲノムにおけるSNPの特定のパターンに応じて、個体を遺伝的カテゴリーにグループ分けすることができる。そのような手法では、遺伝的に類似する個体に共通の特性を考慮しながら、そのような遺伝的に類似する個体群に合わせて治療プログラムを調整することができる。

20

30

【0316】

あるいは、「候補遺伝子手法」と呼ばれる方法を利用して、薬物応答を予測する遺伝子を同定することができる。この方法によれば、薬物の標的をコードする遺伝子がわかっている場合（例えば本発明の93870タンパク質）、その遺伝子の全ての共通変種は、個体群の中で公平に容易に同定することができ、1つの形の遺伝子に対して別の形のものを有することが特定の薬物応答に関連するかどうか、決定することができる。

【0317】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ぶ方法を利用して、薬物応答を予測する遺伝子を同定することができる。例えば、薬物（例えば本発明の93870分子または93870モジュレーター）を投与した動物の遺伝子発現は、毒性に関係する遺伝子経路が刺激されたかどうかを示すことができる。

40

【0318】

上記薬理ゲノム学的手法の複数から生成された情報を使用して、個体の予防的または治療的療法に適切な投薬量および治療プログラムを決定することができる。この知識は、投薬または薬物選択に利用する場合、逆の反応または治療の失敗を回避することができ、したがって、本発明で述べた例示的なスクリーニング・アッセイの1つによって同定されたモジュレーターなど、93870分子または93870モジュレーターで被験体を治療するときに、その治療または予防効率を高めることができる。

【0319】

本発明はさらに、本発明の93870遺伝子の1つまたは複数によってコードされた遺伝

50

子産物の1つまたは複数の活性をモジュレートする薬剤を特定することに基づいた、新しい薬剤または組合せを特定するための方法であって、これらの産物を、治療薬に対する細胞の耐性に関連付けることができる方法を提供する。具体的には、本発明の93870遺伝子によってコードされたタンパク質の活性を、薬剤耐性を克服するための薬剤を特定するための根拠として使用することができる。耐性タンパク質の1つまたは複数の活性を阻止することによって、標的細胞、例えば造血細胞は、非修飾標的細胞が耐性を持っていた薬剤による治療を受け易くなる。

【0320】

93870タンパク質の発現または活性に対する薬剤（例えば薬物）の影響をモニターすることは、臨床試験で利用することができる。例えば、93870遺伝子発現、タンパク質レベルを増大させ、または93870活性をアップレギュレートするよう本明細書で述べたスクリーニング・アッセイによって決定された薬剤の有効性は、93870遺伝子発現、タンパク質レベルが低下しまたは93870活性がダウンレギュレートされた被験体の臨床試験でモニターすることができる。あるいは、93870遺伝子発現、タンパク質レベルを低下させ、または93870活性をダウンレギュレートするよう本明細書で述べたスクリーニング・アッセイによって決定された薬剤の有効性は、93870遺伝子発現、タンパク質レベルが増大しまたは93870活性がアップレギュレートされた被験体の臨床試験でモニターすることができる。そのような臨床試験では、93870遺伝子、好ましくは例えば93870関連障害に関わるその他の遺伝子の発現または活性を、特定の細胞の表現型の「読出し（read out）」またはマーカーとして使用することができる。

10

20

【0321】

その他の実施形態

別の態様で、本発明は、複数の捕捉プローブを分析する方法を特徴とする。この方法は、例えば遺伝子発現を分析するのに有用である。この方法は、複数のアドレスを有する2次元アレイを提供することであって、複数のアドレスのそれぞれの位置が複数のアドレスのそれぞれと互いに区別可能であり、複数のアドレスのそれぞれが固有の捕捉プローブ、例えば核酸またはペプチド配列を有し、その捕捉プローブが、93870を発現する細胞または被験体からのものでありまたは93870で媒介される応答が引き起こされる細胞または被験体からのものであること；そのアレイを93870核酸（好ましくは精製済み）、93870ポリペプチド（好ましくは精製済み）、または抗93870抗体に接触させることを含み、それによって複数の捕捉プローブを評価する。例えば核酸の場合、複数のアドレスでのハイブリダイゼーションと捕捉プローブとの結合が、例えば93870核酸、ポリペプチド、または抗体に結合した標識から生成されたシグナルによって検出される。

30

【0322】

捕捉プローブは、例えば対照または刺激を受けていない組織または細胞から得られた核酸のサンプルなど、選択されたサンプルからの一組の核酸でよい。

【0323】

この方法は、93870核酸、ポリペプチド、または抗体を、複数の捕捉プローブを有する第1のアレイ、および異なる複数の捕捉プローブを有する第2のアレイに接触させることを含むことができる。各ハイブリダイゼーションの結果を比較して、第1のサンプルと第2のサンプルとの発現の相違を分析することができる。第1の複数の捕捉プローブは、例えば野生型や、正常、非罹患などの対照サンプル、または例えば生物学的流体や組織、細胞サンプルなどの刺激を受けていないサンプルからのものでよい。第2の複数の捕捉プローブは、例えば突然変異型や疾病状態または障害状態の危険性があるような実験サンプル、または例えば生物学的流体や組織、細胞サンプルなどの刺激を受けたサンプルからのものでよい。

40

【0324】

複数の捕捉プローブは複数の核酸プローブでよく、そのそれぞれは93870の対立遺伝

50

子と特異的にハイブリダイズする。そのような方法は、被験体の診断に使用することができ、例えば疾病や障害の危険性を評価し、選択された治療が被験体に適切であるかどうかを評価し、被験体が疾病または障害を持っているかどうかを評価するのに使用することができる。

【0325】

この方法は、上述のSNPの検出に使用することができる。

【0326】

別の態様で、本発明は、93870を分析する方法、例えば構造や機能、他の核酸やアミノ酸配列との関連性を分析する方法を特徴とする。この方法は、93870核酸またはアミノ酸配列を提供すること；93870配列を、例えば核酸やタンパク質の配列のデータベースなど、配列の集まりからの複数の配列の1つまたは複数の好ましい配列と比較することを含み、それによって93870を分析する。

10

【0327】

この方法は、93870配列とデータベースの配列との同一性を評価することを含むことができる。この方法は、例えばインターネット上で、第2のサイトでデータベースにアクセスすることにより実行できる。好ましいデータベースには、GenBank（商標）およびSwissProtが含まれる。

【0328】

別の態様で、本発明は、例えばSNPを同定しまたは93870の特異的対立遺伝子を同定するのに有用な一組のオリゴヌクレオチドを特徴とする。この組は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、そのそれぞれは、例えばSNPや突然変異の部位など、呼掛け位置で異なるヌクレオチドを有している。好ましい実施形態で、複数のオリゴヌクレオチドは、互いにその配列が同一である（長さの相違は除く）。オリゴヌクレオチドには、異なる標識を付けることができ、その結果、1つの対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、第2の対立遺伝子とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと区別可能なシグナルを提供するようになる。

20

【0329】

93870分子の配列は、その使用を容易にするために様々な媒体で提供される。配列は、単離された核酸またはアミノ酸分子以外に93870分子を含有する製品として提供することができる。そのような製品は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列あるいはそのサブセットを検査する際、それらが自然に存在しまたは精製された形のままで直接適用できない手段を使用して製品を検査することが可能な形態で、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列、例えばオープン・リーディング・フレームを提供することができる。

30

【0330】

93870ヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、コンピュータの可読媒体に記録することができる。本明細書で使用する「コンピュータ可読媒体」は、コンピュータで直接読み取ってアクセスすることができる任意の媒体を指す。そのような媒体には、フロッピー・ディスクやハード・ディスク記憶媒体、磁気テープなどの磁気記録媒体；コンパクト・ディスクやCD-ROMなどの光記録媒体；RAMやROM、EPROM、EEPROMなどの電気記憶媒体；汎用ハード・ディスク、および磁気/光記憶媒体などこれらカテゴリーのハイブリッドが含まれるがこれらに限定されない。媒体は、そこに本発明の9387配列情報が保持されるように適合されまたは構成される。

40

【0331】

本明細書で使用する「電子装置」という用語は、データまたは情報を記憶するよう構成され適合されたその他の機器の任意の適切な計算または処理装置を含むものとする。本発明と共に使用するのに適する電子装置には、独立型コンピュータ装置；ローカル・エリア・ネットワーク（LAN）、ワイド・エリア・ネットワーク（WAN）、インターネット、イントラネット、エクストラネットを含むネットワーク；パーソナル・デジタル・アシスタンス（PDA）、携帯電話、ポケットベルなどの電子器具；ローカルおよび分散型処理システムが含まれる。

50

【0332】

本明細書で使用する「記録された」は、電子装置可読媒体に情報を記憶しコードするためのプロセスを指す。当業者なら、93870配列情報を含む製品が生成されるよう既知の媒体に情報を記録するために、現在知られている方法のいずれかを容易に採り入れることができる。

【0333】

本発明の93870ヌクレオチドまたはアミノ酸配列が記録されるコンピュータ可読媒体を生成するため、当業者なら、様々なデータ記憶構造が利用可能である。データ記録構造の選択は、一般に記憶された情報にアクセスするよう選択された手段に基づくことになる。さらに、様々なデータ・プロセッサ・プログラムおよびフォーマットを使用して、コンピュータ可読媒体に本発明のヌクレオチド配列情報を記憶することができる。配列情報は、Word PerfectやMicrosoft Wordなど市販のソフトウェアでフォーマットされたワード・プロセッシング・テキスト・ファイルに示すことができ、またはDB2やSybase、Oracleなどのデータベース・アプリケーションに記憶されたASCIIファイルの形で示すことができる。当業者は、本発明のヌクレオチド配列が記録されているコンピュータ可読媒体を得るために、任意の数のデータ・プロセッサ構築フォーマット（例えばテキスト・ファイルやデータベース）を容易に適合させることができる。

10

【0334】

本発明の93870ヌクレオチドまたはアミノ酸配列をコンピュータ可読形態で提供することによって、当業者は、様々な目的で配列情報に日常的にアクセスすることができる。例えば当業者は、コンピュータ可読形態の本発明のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を使用して、標的配列または標的構造モチーフとデータ記憶手段に記憶された配列情報とを比較することができる。特定の標的配列または標的モチーフに一致する本発明の配列の断片または領域を特定するために、検索を行う。

20

【0335】

したがって本発明は、GPCRまたは93870関連の疾病または障害、あるいはGPCRまたは93870関連の疾病または障害に対する素因を被験体が有するか否かを決定する方法を実行するための取扱説明書を保持する媒体を提供し、その決定方法は、被験体に関連する93870配列情報を決定するステップ、この93870配列情報に基づいて、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害を有するか否かを決定するステップ、および/またはその疾病、障害、または疾病前の状態に対して特定の治療を推奨するステップを含むものである。

30

【0336】

本発明はさらに、電子システムおよび/またはネットワークで、被験体が93870またはGPCR関連の疾病または障害、あるいは93870に関連する疾病の素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、この方法は、被験体に関連する93870配列情報を決定するステップ、この93870配列情報に基づいて、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害あるいはGPCRまたは93870に関連する疾病または障害の素因を有するか否かを決定するステップ、および/またはその疾病、障害、または疾病前の状態に対して特定の治療を推奨するステップを含む。この発明はさらに、被験体に関連する表現型情報を受け取るステップ、および/または被験体に関連する表現型情報をネットワークから獲得するステップを含む。

40

【0337】

また本発明は、ネットワークで、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害、あるいはGPCRまたは93870に関連する疾病または障害の素因を有するか否かを決定するための方法も提供し、前記方法は、93870配列情報および/またはそれに関連する情報を被験体から受け取るステップ、被験体に関連する表現型情報を受け取るステップ、93870に対応しかつ/またはGPCRまたは93870関連の疾病または障害に対応する情報をネットワークから獲得するステップ、表現型情報、93870情報（

50

例えば配列情報および/またはそれに関連する情報)、および獲得した情報の1つまたは複数に基づいて、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害あるいはGPCRまたは93870関連の疾病または障害の素因を有するか否か決定するステップを含む。この方法は、疾病、障害、または疾病前の状態に対する特定の治療を推奨するステップをさらに含んでよい。

【0338】

また本発明は、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害、あるいはGPCRまたは93870関連の疾病または障害の素因を有するか否かを決定するためのビジネス・メソッドも提供し、前記方法は、93870に関連する情報(例えば配列情報および/またはそれに関連する情報)を受け取るステップ、被験体に関連する表現型情報を受け取るステップ、93870に関連しかつ/またはGPCRまたは93870関連の疾病または障害に関連する情報をネットワークから獲得するステップ、表現型情報、93870情報、および獲得した情報の1つまたは複数に基づいて、被験体がGPCRまたは93870関連の疾病または障害あるいはGPCRまたは93870関連の疾病または障害の素因を有するか否か決定するステップを含む。この方法は、疾病、障害、または疾病前の状態に対する特定の治療を推奨するステップをさらに含んでよい。

10

【0339】

また本発明は、本発明の93870配列を含んだアレイも含む。アレイは、そのアレイ内の1つまたは複数の遺伝子の発現のアッセイを行うのに使用することができる。一実施形態で、アレイは、そのアレイ内の遺伝子の組織特異性を確認するために、組織内での遺伝子発現のアッセイを行うのに使用することができる。このように、発現に関して最大約7600の遺伝子を同時にアッセイにかけることができ、その1つが93870になり得る。このため、1つまたは複数の組織内で特異的に発現した一組の遺伝子を示すプロフィールを作り出すことが可能になる。

20

【0340】

そのような定性的情報の他、本発明では遺伝子発現の定量が可能である。したがって組織特異性だけではなく、組織内での一組の遺伝子の発現レベルを確認することができる。したがって遺伝子を、その組織発現自体および組織内での発現レベルに基づいて分類することができる。これは、例えば組織内での遺伝子発現の関係を確認する際に有用である。したがって、1つの組織を乱して、第2の組織内での遺伝子発現に対する影響を決定することができる。その意味で、生物学的刺激に応答する1つの細胞型の別の細胞型に対する作用を決定することができる。そのような決定は、例えば遺伝子発現のレベルで細胞と細胞の相互作用の影響を知るのに有用である。薬剤を、1つの細胞型を処理するために治療を目的としてそこに投与するが、その薬剤が別の細胞型に望ましくない影響を及ぼす場合、本発明は、分子ベースの望ましくない影響を決定するアッセイを提供し、したがってその望ましくない影響を打ち消す薬剤を同時投与し、またはその他の方法でその望ましくない影響を処理する機会を提供する。同様に、単一細胞型であっても、分子レベルで望ましくない生物学的作用を決定することができる。したがって、標的遺伝子以外の発現に対する薬剤の影響を確認し、打ち消すことができる。

30

【0341】

別の実施形態では、アレイを使用して、アレイ内の1つまたは複数の遺伝子の発現の時間経過をモニターすることができる。これは、例えば93870関連の疾病または障害の発症、93870関連の疾病または障害の進行、93870関連の疾病または障害に関連する細胞の形質転換といったプロセスなど、本明細書で開示される様々な生物学的分野で行うことができる。

40

【0342】

またアレイは、同じ細胞または異なる細胞で、遺伝子の発現が他の遺伝子の発現に及ぼす影響を確認するのに有用である(例えば、他の遺伝子の発現に対する93870発現の影響の確認)。これは例えば、最終的なまたは下流の標的を調節することができない場合に、治療的介入のために代替の分子標的の選択を行う。

50

【0343】

またこのアレイは、正常なまたは異常な細胞で、1つまたは複数の遺伝子の差次的発現パターンを確認するのにも有用である。これは、診断または治療的介入のため分子標的としての役割を果たすことができる一組の遺伝子（例えば93870を含む）を提供する。

【0344】

本明細書で使用する「標的配列」は、6以上のヌクレオチドまたは2以上のアミノ酸の任意のDNAまたはアミノ酸配列でよい。当業者なら、標的配列が長くなるほど、その標的配列はランダムな出現状態でデータベース内に存在しにくくなることを、容易に理解することができる。標的配列の典型的な配列の長さは、約10～100アミノ酸または約30～300ヌクレオチド残基である。しかし、遺伝子発現およびタンパク質の処理に關与する配列断片など商用として重要な断片は、より短い長さのものでよいことが十分理解されよう。

10

【0345】

コンピュータ・ソフトウェアは公に利用可能であり、分析および他の配列との比較のため、コンピュータ可読媒体に提供された配列情報に当業者はアクセスすることができる。様々な既知のアルゴリズムが公に開示されており、検索手段を実行するための様々な市販のソフトウェアを本発明のコンピュータ・ベースのシステムで使用し、また使用することができる。そのようなソフトウェアの例には、MacPattern (EMBL)、BLASTN、およびBLASTX (NCBI)が含まれるが、これらに限定されない。

【0346】

したがって本発明は、コンピュータ可読マトリックス上の配列を記録することを含む、93870配列のコンピュータ可読記録を作製する方法を特徴とする。好ましい実施形態で、記録は、下記の1つまたは複数、すなわちORFの識別；ドメイン、領域、または部位の識別；転写開始部の識別；転写ターミネーターの識別；タンパク質またはその成熟形態の完全長アミノ酸配列；翻訳領域の5'末端の1つまたは複数を含む。

20

【0347】

別の態様で、本発明は、配列を分析する方法を特徴とする。この方法は、93870配列または記録をコンピュータ可読形態で提供すること、この93870配列と第2の配列を比較することを含み、それによって配列を分析する。比較は、配列の同一性に関して配列を比較すること、または1つの配列が他の配列に含まれるかどうか決定すること、すなわち比較する配列が93870配列に含まれるかどうか決定することを含むことができる。好ましい実施形態で、93870または第2の配列は、例えば第1のサイトで第1のコンピュータに記憶され、比較は、例えば第2のサイトで、第2の配列上で実行され、読み取られ、または記録される。例えば93870または第2の配列は、1つのコンピュータの公のまたは私有のデータベースに記憶することができ、比較の結果は、第2のコンピュータ上で実行され、読み取られ、記録される。好ましい実施形態で、記録は、下記の1つまたは複数、すなわちORFの識別；ドメイン、領域、または部位の識別；転写開始部の識別；転写ターミネーターの識別；タンパク質またはその成熟形態の完全長アミノ酸配列；翻訳領域の5'末端の1つまたは複数を含む。

30

【0348】

本願全体を通して引用された全ての参考文献、特許、および公開特許出願を、参照により本明細書に組み込む。

40

【実施例】

【0349】

遺伝子発現分析

製造業者の指示 (TelTes, Inc.) に従いRNA STAT-60を使用する一段階抽出法によって、様々なヒト組織からトータルRNAを調製した。各RNA調製物を、37で1時間、DNase I (Ambion) で処理した。DNase I処理は、サンプルが、内部増幅産物リファレンスとして2マイクログロブリンを使用する蛍光の閾値レベルに達するのに少なくとも38PCR増幅サイクルを必要とする場合に終了する

50

よう定めた。DNase I 処理後の RNA サンプルの完全性を、アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム染色によって確認した。フェノール抽出後、製造業者の指示 (GibcoBRL) に従い SUPERSCRIPT (商標) Choice System を使用して、サンプルから cDNA を調製した。逆転写酵素を用いない RNA の負の調節を、各 RNA サンプルごとに模擬逆転写した。

【0350】

ヒト 93870 発現を、様々な正常および罹患 (例えば癌など) ヒト組織または細胞系から調製した cDNA 中で、TaqMan (登録商標) 定量 PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems) を使用して測定した。

【0351】

プローブは、ヒト 93870 遺伝子の配列に基づいて、Primer Express ソフトウェア (PE Biosystems) により設計した。各ヒト 93870 遺伝子プローブを、FAM (6-カルボキシフルオレセイン) を使用して標識し、2 ミクログロブリン・リファレンス・プローブを、異なる蛍光色素、VIC で標識した。このように標的遺伝子と内部リファレンス遺伝子の標識を異ならせることによって、同じウェル内で測定することが可能になる。2 ミクログロブリンと標的遺伝子の両方に対する正および逆プライマーおよびプローブを、TaqMan (登録商標) Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) に加えた。プライマーとプローブの最終濃度は様々であるが、いずれも所与の実験では本質的に変わらなかった。典型的な実験は、正および逆プライマー 200 nM と 2 ミクログロブリンに対するプローブ 100 nM を合わせたもの、正および逆プライマー 600 nM と標的遺伝子に対するプローブ 200 nM を合わせたものを含んでいた。TaqMan マトリックス実験は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystem) で行った。熱サイクラー条件は以下の通りであった。すなわち 50 で 2 分間、95 で 10 分間保持した後、95 で 15 秒間、その後 60 で 1 分間の 2 段階 PCR を 40 サイクル実行した。

【0352】

下記の方法を使用して、様々な組織でのヒト 93870 遺伝子発現を、同じ組織での 2 ミクログロブリン発現に対して定量的に計算した。閾値サイクル (Ct) の値は、統計的に有意な蛍光増加が検出されるサイクルと定義する。低い Ct 値は、mRNA 濃度が高いことを示す。ヒト 93870 遺伝子の Ct 値は、以下の式、 ${}_{?}Ct = Ct_{human93870} - Ct_{microglobulin}$ を使用して、2 ミクログロブリン遺伝子の Ct 値を差し引いて ${}_{?}Ct$ 値を得ることにより正規化する。次いでヒト 93870 遺伝子の発現が比較的低いレベルであることを示す cDNA サンプルに対して発現を校正する。次いで以下の式、 ${}_{??}Ct = {}_{?}Ct_{sample} - {}_{?}Ct_{calibrator}$ に従い、校正サンプル (calibrator sample) に関する ${}_{?}Ct$ 値を各組織サンプルに関する ${}_{?}Ct$ 値から差し引く。次いで $2^{-{}_{??}Ct}$ で与えられる数式を使用して、相対発現を計算する。次いで試験をした組織それぞれでの標的ヒト 93870 遺伝子の発現を、以下により詳細に論じるようにグラフで表す。

【0353】

結果は、正常な骨髄単核細胞および好中球での 93870 発現が高レベルであり、ヒト骨芽細胞での 93870 発現が中レベルであり、巨核球での 93870 発現であることを示している。

【0354】

本願全体を通して引用された全ての参考文献、特許、および公開特許出願の内容を、参照により本明細書に援用する。

【0355】

均等物

当業者なら、本明細書で述べた本発明の特定の実施形態の多くの均等物を理解し、または通常の実験のみ使用して確認することができるであろう。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されるものとする。

10

20

30

40

50

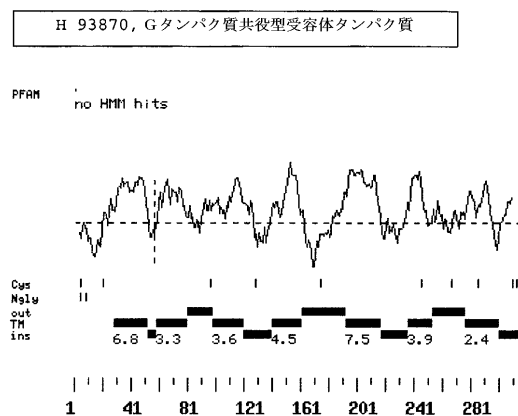
【図面の簡単な説明】

【0356】

【図1】ヒト93870のヒドロパシー・プロットを示す図である。比較的疎水性の高い残基が水平破線の上方に示され、比較的親水性の高い残基が水平破線の下方に示されている。システイン残基(cys)は、ヒドロパシー曲線の下方に短い垂直線で示す。ヒト93870のアミノ酸配列に相当する数がx軸に示される。本発明のポリペプチドは、疎水性配列の全てまたは一部であって、例えば破線上方の配列、例えば配列番号2のアミノ酸60～80あたり、140～160あたり、210～230あたりの配列；親水性配列の全てまたは一部であって、例えば破線下方の配列、例えば配列番号2のアミノ酸125～135あたり、160～170あたり、210～230あたりの配列；Cysまたはグリコシル化部位を含む配列を含んだ断片を含む。

10

【図1】



【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



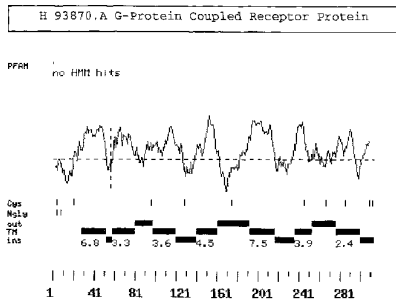
(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070657 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
 - (21) International Application Number: PCT/US02/06455
 - (22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)
 - (25) Filing Language: English
 - (26) Publication Language: English
 - (30) Priority Data: 60/272,677 1 March 2001 (01.03.2001) US
 - (71) Applicant: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
 - (72) Inventor: GLUCKSMANN, Maria, Alexandra; 33 Summit Road, Lexington, MA 02173 (US).
 - (74) Agent: SILVERI, Jean, M.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
 - (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, FR, GE, GR, GU, HK, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, ST, SV, SZ, TD, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
 - (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: 93870, A HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USES THEREFOR



(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated 93870 nucleic acid molecules, which encode GPCRs. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing 93870 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and non-human transgenic animals in which a 93870 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated 93870 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-93870 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

WO 02/070657 A2

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-1-

93870, A HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USES THEREFOR**Cross-References to Related Applications**

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Number
5 60/272,677 filed March 1, 2001, the contents of which are incorporated herein by this
reference.

Background of the Invention

[0002] G-protein coupled receptors (GPCRs) are seven transmembrane domain proteins
10 that mediate signal transduction of a diverse number of ligands through heterotrimeric G
proteins (Strader, C. D. et al. (1994) *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132). G protein-coupled
receptors (GPCRs), along with G-proteins and effector proteins (e.g., intracellular enzymes
and channels), are the components of a modular signaling system. Upon ligand binding to an
15 extracellular portion of a GPCR, different G proteins are activated, which in turn modulate
the activity of different intracellular effector enzymes and ion channels (Gutkind, J.S. (1998)
J. Biol. Chem. 273: 1839-1842; Selbie, L.A. and Hill, S.J. (1998) *Trends Pharmacol. Sci.*
19:87-93).

[0003] G proteins represent a family of heterotrimeric proteins composed of α , β and γ
subunits, which bind guanine nucleotides. These proteins are usually linked to cell surface
20 receptors (e.g., a GPCR). Following ligand binding to a GPCR, a conformational change is
transmitted to the G protein, which causes the α -subunit to exchange a bound GDP molecule
for a GTP molecule and to dissociate from the $\beta\gamma$ -subunits. The GTP-bound form of the α -
subunit typically functions as an effector-modulating moiety, leading to the production of
second messengers, such as cyclic AMP (e.g., by activation of adenylate cyclase),
25 diacylglycerol or inositol phosphates. Greater than 20 different types of α -subunits are known
in man, which associate with a smaller pool of β and γ subunits. Examples of mammalian G
proteins include G_i , G_o , G_q , G_s and G_t (Lodish H. et al. *Molecular Cell Biology*, (Scientific
American Books Inc., New York, N.Y., 1995).

[0004] GPCRs are of critical importance to several systems including the endocrine
30 system, the central nervous system and peripheral physiological processes. The GPCR genes
and gene-products are also believed to be causative agents of disease (Spiegel et al. (1993) *J.*
Clin. Invest. 92:1119-1125); McKusick and Amberger (1993) *J. Med. Genet.* 30:1-26). Given
the important biological roles and properties of GPCRs, there exists a need for the

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-2-

identification of novel genes encoding such proteins as well as for the discovery of modulators of such molecules for use in regulating a variety of normal and/or pathological cellular processes.

5 **Summary of the Invention**

[0005] The present invention is based, in part, on the discovery of a novel GPCR, with similarities to Subfamily I of G- protein coupled receptor type proteins (GPCRs), referred to herein as "93870". The nucleotide sequence of a cDNA encoding 93870 is shown in SEQ ID NO:1, and the amino acid sequence of a 93870 polypeptide is shown in SEQ ID NO:2. In

10 addition, the nucleotide sequence of the coding region is depicted in SEQ ID NO:3.

[0006] Accordingly, in one aspect, the invention features a nucleic acid molecule which encodes a 93870 protein or polypeptide, e.g., a biologically active portion of the 93870 protein. In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule encodes a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. In other embodiments, the invention

15 provides an isolated 93870 nucleic acid molecule having the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the sequence of the DNA insert of the plasmid deposited with ATCC on ___ as Accession Number ___ (hereafter, "the deposited nucleotide sequence").

[0007] In still other embodiments, the invention provides nucleic acid molecules that are sufficiently or substantially identical (e.g., naturally occurring allelic variants) to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleic acid sequence. In other embodiments, the invention provides a nucleic acid molecule which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide

25 sequence, wherein the nucleic acid encodes a full length 93870 protein or an active fragment thereof.

[0008] In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include a 93870 nucleic acid molecule described herein. In certain embodiments, the nucleic acid molecules of the invention are operatively linked to native or heterologous regulatory sequences. Also included, are vectors and host cells containing the 93870 nucleic acid

30 molecules of the invention e.g., vectors and host cells suitable for producing polypeptides.

[0009] In another related aspect, the invention provides nucleic acid fragments suitable as primers or hybridization probes for the detection of 93870-encoding nucleic acids.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-3-

[0010] In still another related aspect, isolated nucleic acid molecules that are antisense to a 93870 encoding nucleic acid molecule are provided.

[0011] In another aspect, the invention features 93870 polypeptides, and biologically active or antigenic fragments thereof that are useful, e.g., as reagents or targets in assays applicable to treatment and diagnosis of 93870-mediated or related disorders, e.g., GPCR disorders as described herein. In another embodiment, the invention provides 93870 polypeptides having a 93870 activity. Preferred polypeptides are 93870 proteins including at least one, two, three, four, five, six or seven transmembrane domains, and, preferably, having a 93870 activity, e.g., a 93870 activity as described herein. Preferred polypeptides are 93870 proteins including at least one receptor coupled G-protein transmembrane domain.

[0012] In other embodiments, the invention provides 93870 polypeptides, e.g., a 93870 polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or the amino acid sequence encoded by the cDNA insert of the plasmid deposited with ATCC Accession Number ____; an amino acid sequence that is sufficiently or substantially identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or the amino acid sequence encoded by the cDNA insert of the plasmid deposited with ATCC Accession Number ____; or an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 or the nucleotide sequence of the insert of the plasmid deposited with ATCC Accession Number ____, wherein the nucleic acid encodes a full length 93870 protein or an active fragment thereof.

[0013] In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include a 93870 nucleic acid molecule described herein.

[0014] In a related aspect, the invention provides 93870 polypeptides or fragments operatively linked to non-93870 polypeptides to form fusion proteins.

[0015] In another aspect, the invention features antibodies and antigen-binding fragments thereof, that react with, or more preferably specifically or selectively bind 93870 polypeptides.

[0016] In another aspect, the invention provides methods of screening for compounds that modulate the expression or activity of the 93870 polypeptides or nucleic acids.

[0017] In still another aspect, the invention provides a process for modulating 93870 polypeptide or nucleic acid expression or activity, e.g. using the screened compounds. In certain embodiments, the methods involve treatment of conditions related to aberrant activity

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-4-

or expression of the 93870 polypeptides or nucleic acids, such as conditions involving aberrant or deficient cellular proliferation or differentiation.

[0018] The invention also provides assays for determining the activity of or the presence or absence of 93870 polypeptides or nucleic acid molecules in a biological sample, including for disease diagnosis.

[0019] In another aspect, the invention features a two dimensional array having a plurality of addresses, each address of the plurality being positionally distinguishable from each other address of the plurality, and each address of the plurality having a unique capture probe, *e.g.*, a nucleic acid or peptide sequence. At least one address of the plurality has a capture probe that recognizes a 93870 molecule. In one embodiment, the capture probe is a nucleic acid, *e.g.*, a probe complementary to a 93870 nucleic acid sequence. In another embodiment, the capture probe is a polypeptide, *e.g.*, an antibody specific for 93870 polypeptides. Also featured is a method of analyzing a sample by contacting the sample to the aforementioned array and detecting binding of the sample to the array.

[0020] In further aspect the invention provides assays for determining the presence or absence of a genetic alteration in a 93870 polypeptide or nucleic acid molecule, including for disease diagnosis.

Brief Description of the Drawing

[0021] *Figure 1* depicts a hydropathy plot of human 93870. Relatively hydrophobic residues are shown above the dashed horizontal line, and relatively hydrophilic residues are below the dashed horizontal line. The cysteine residues (cys) are indicated by short vertical lines below the hydropathy trace. The numbers corresponding to the amino acid sequence of human 93870 are indicated on the x axis. Polypeptides of the invention include fragments which include: all or part of a hydrophobic sequence, *e.g.*, a sequence above the dashed line, *e.g.*, the sequence from about amino acid 60 to 80, from about 140 to 160, and from about 210 to 230 of SEQ ID NO:2; all or part of a hydrophilic sequence, *e.g.*, a sequence below the dashed line, *e.g.*, the sequence from about amino acid 125 to 135, from about 160 to 170, and from about 210 to 230 of SEQ ID NO:2; a sequence which includes a Cys, or a glycosylation site.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-5-

Detailed Description of the Invention

[0022] The human 93870 sequence (SEQ ID NO:1), which is approximately 1684 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 942 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:3). The coding sequence encodes a 313 amino acid protein (SEQ ID NO:2).

[0023] A plasmid containing the nucleotide sequence encoding human 93870 was deposited with American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on _____ and assigned Accession Number _____. This deposit will be maintained under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure. This deposit was made merely as a convenience for those of skill in the art and is not an admission that a deposit is required under 35 U.S.C. §112.

[0024] The 93870 protein contains a number of structural characteristics in common with members of the G-protein coupled receptor family, and in particular the subfamily-1 of the G-protein coupled receptors. The term "family" when referring to the protein and nucleic acid molecules of the invention means two or more proteins or nucleic acid molecules having a common structural domain or motif and having sufficient amino acid or nucleotide sequence homology as defined herein. Such family members can be naturally or non-naturally occurring and can be from either the same or different species. For example, a family can contain a first protein of human origin as well as other distinct proteins of human origin, or alternatively, can contain homologues of non-human origin, e.g., rat or mouse proteins. Members of a family can also have common functional characteristics.

[0025] The G-protein coupled receptor family of seven transmembrane proteins is an extensive group of proteins, which transduce extracellular signals triggered by, e.g., hormones, neurotransmitters, odorants and light, by interaction with guanine nucleotide-binding (G) proteins. The N-terminus of G-protein coupled receptors is typically located on the extracellular side of the membrane and is often glycosylated, while the C-terminus is cytoplasmic and generally phosphorylated. G-protein coupled receptors typically have seven hydrophobic membrane spanning regions. Three extracellular loops alternate with three intracellular loops to link the seven transmembrane regions. Some G-protein coupled receptors possess a signal peptide. Generally, the most conserved portions of G-protein coupled receptors are the transmembrane regions and the first two cytoplasmic loops. A conserved arginine-aromatic doublet is present in the N-terminal extremity of the second

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-6-

cytoplasmic loop and may be implicated in the interaction with G proteins. Alignments of the domains of 1308 representative GPCRs can be found at

[http://www.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-](http://www.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/ReqProdomII.pl?id_dom0=PD000009&prodom_release=2000.1)

[bin/ReqProdomII.pl?id_dom0=PD000009&prodom_release=2000.1](http://www.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/ReqProdomII.pl?id_dom0=PD000009&prodom_release=2000.1). Thus, the 93870

5 proteins of the invention include the following structural features that demonstrate their inclusion in the G-protein coupled receptor family: (1) an N-terminal extracellular domain; (2) seven transmembrane domains; (3) three extracellular loops; (4) three cytoplasmic loops, one of which includes the conserved arginine-aromatic doublet; and (5) a C-terminal cytoplasmic domain.

10 **[0026]** In one embodiment, a 93870 protein includes at least one extracellular domain. When located at the N-terminal domain the extracellular domain is referred to herein as an "N-terminal extracellular domain" in the amino acid sequence of the protein. As used herein, an "N-terminal extracellular domain" includes an amino acid sequence having about 1-100, preferably about 1-75, more preferably about 1-50, even more preferably about 1-30 amino acid residues in length and is located outside of a cell or extracellularly. The C-terminal amino acid residue of a "N-terminal extracellular domain" is adjacent to an N-terminal amino acid residue of a transmembrane domain in a naturally-occurring 93870 or 93870-like protein. For example, an N-terminal extracellular domain is located at about amino acid residues 1-27 of SEQ ID NO:2.

20 **[0027]** In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide or protein has an "N-terminal extracellular domain" or a region which includes at least about 1-100, preferably about 1-50, and even more preferably about 1-30 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with an "N-terminal extracellular domain," e.g., the N-terminal extracellular domain of human 93870 (e.g., residues 1-27 of SEQ ID NO:2).

25 Preferably, the N-terminal extracellular domain is capable of interacting with (e.g., binding to) an extracellular signal, for example, a ligand or a cell surface receptor. Most preferably, the N-terminal extracellular domain mediates protein-protein interactions, signal transduction and/or cell adhesion.

[0028] In another embodiment, a 93870 protein includes at least one, two, three, four, 30 five, six, or preferably, seven transmembrane domains. As used herein, the term "transmembrane domain" includes an amino acid sequence of about 15 amino acid residues in length that spans the plasma membrane. More preferably, a transmembrane domain includes about at least 20, 23, 24, 25, 30 or 35 amino acid residues and spans the plasma membrane. Transmembrane domains are rich in hydrophobic residues, and typically have an α -helical

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-7-

structure. In a preferred embodiment, at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% or more of the amino acids of a transmembrane domain are hydrophobic, e.g., leucines, isoleucines, tyrosines, or tryptophans. Transmembrane domains are described in, for example, <http://pfam.wustl.edu/cgi-bin/getdese?name=7tm-1>, and Zagotta W.N. et al, (1996) *Annual Rev. Neurosci.* 19: 235-63, the contents of which are incorporated herein by reference. The human 93870 also has seven transmembrane domains extending from about amino acid 28 (extracellular end) to about amino acid 51 (cytoplasmic end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 58 (cytoplasmic end) to about amino acid 79 (extracellular end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 98 (extracellular end) to about amino acid 119 (cytoplasmic end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 140 (cytoplasmic end) to about amino acid 160 (extracellular end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 192 (extracellular end) to about amino acid 216 (cytoplasmic end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 236 (cytoplasmic end) to about amino acid 252 (extracellular end) of SEQ ID NO:2; from about amino acid 276 (extracellular end) to about amino acid 299 (cytoplasmic end) of SEQ ID NO:2;

[0029] In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide or protein has at least one transmembrane domain or a region which includes at least 15, 20, 23, 24, 25, 30 or 35 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with a "transmembrane domain," e.g., at least one transmembrane domain of human 93870 (e.g., residues 28-51, 58-79, 98-119, 140-160, 192-216, 236-252, and 276-299 of SEQ ID NO:2).

Preferably, the transmembrane domain is involved in transducing a signal, e.g., an extracellular signal across a cell membrane, and/or activates a signal transduction pathway.

[0030] In another embodiment, a 93870 protein includes at least one extracellular loop. As defined herein, the term "loop" includes an amino acid sequence having a length of at least about 4, preferably about 5-10, more preferably about 10-20, and even more preferably about 20-30 amino acid residues, and which connects two transmembrane domains within a protein or polypeptide. Accordingly, the N-terminal amino acid of a loop is adjacent to a C-terminal amino acid of a transmembrane domain in a naturally-occurring 93870 or 93870-like molecule, and the C-terminal amino acid of a loop is adjacent to an N-terminal amino acid of a transmembrane domain in a naturally-occurring 93870 or 93870-like molecule. As used herein, an "extracellular loop" includes an amino acid sequence located outside of a cell, or extracellularly. For example, an extracellular loop can be found at about amino acids 80-97, 161-191, and 253-275 of SEQ ID NO:2.

[0031] In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide or protein has at least one extracellular loop or a region which includes at least about 4, preferably about 5-10, more

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-8-

preferably about 10-20, more preferably about 20-30, and most preferably about 30-40 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with an "extracellular loop," e.g., at least one extracellular loop of human 93870 (e.g., residues 80-97, 161-191, and 253-275 of SEQ ID NO:2).

5 **[0032]** In another embodiment, a 93870 protein includes at least one cytoplasmic loop, also referred to herein as a cytoplasmic domain. As used herein, a "cytoplasmic loop" includes an amino acid sequence having a length of at least about 4, preferably about 5-10, more preferably about 10-20, more preferably about 20-30, and most preferably about 30-40 amino acid residues located within a cell or within the cytoplasm of a cell. For example, a
10 cytoplasmic loop is found at about amino acids 52-57, 120-139, and 217-235 of SEQ ID NO:2.

[0033] In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide or protein has at least one cytoplasmic loop or a region which includes at least about 4, preferably about 5-10, more preferably about 10-20, more preferably about 20-30, and most preferably about 30-40 amino
15 acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with an "cytoplasmic loop," e.g., at least one cytoplasmic loop of human 93870 (e.g., residues 52-57, 120-139, and 217-235 of SEQ ID NO:2). Within the cytoplasmic loop, the human 93870 polypeptide also has a arginine, tyrosine (aromatic) doublet at amino acids about 121-122 of SEQ ID NO:2 respectively, matching the conserved arginine-aromatic doublet that is present
20 in the N-terminal extremity of the second cytoplasmic loop of most G protein coupled transmembrane receptors. The conserved doublet is implicated in the interaction with the G-protein.

[0034] In another embodiment, a 93870 protein includes a "C-terminal cytoplasmic domain", also referred to herein as a C-terminal cytoplasmic tail, in the sequence of the
25 protein. As used herein, a "C-terminal cytoplasmic domain" includes an amino acid sequence having a length of at least about 5, and preferably about 10-50 amino acid residues, and is located within a cell or within the cytoplasm of a cell. Accordingly, the N-terminal amino acid residue of a "C-terminal cytoplasmic domain" is adjacent to a C-terminal amino acid residue of a transmembrane domain in a naturally-occurring 93870 or 93870-like protein. For
30 example, a C-terminal cytoplasmic domain is found at about amino acid residues 300-313 of SEQ ID NO:2.

[0035] In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide or protein has a C-terminal cytoplasmic domain or a region which includes at least about 5, and preferably about 10-50 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100%

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-9-

homology with an "C-terminal cytoplasmic domain," e.g., the C-terminal cytoplasmic domain of human 93870 (e.g., residues 300-313 of SEQ ID NO:2).

[0036] Based on structural similarities, members of the GPCR family have been classified into various subfamilies, including: Subfamily I which comprises receptors typified by rhodopsin and the beta2-adrenergic receptor and currently contains over 200 unique members (reviewed by Dohlman *et al.* (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60:653-688); Subfamily II, which includes the parathyroid hormone/calcitonin/secretin receptor family (Juppner *et al.* (1991) *Science* 254:1024-1026; Lin *et al.* (1991) *Science* 254:1022-1024); Subfamily III, which includes the metabotropic glutamate receptor family in mammals, such as the GABA receptors (Nakanishi *et al.* (1992) *Science* 258: 597-603); Subfamily IV, which includes the cAMP receptor family that is known to mediate the chemotaxis and development of *D. discoideum* (Klein *et al.* (1988) *Science* 241:1467-1472); and Subfamily V, which includes the fungal mating pheromone receptors such as STE2 (reviewed by Kurjan I *et al.* (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61:1097-1129). Within each family, distinct, highly conserved motifs have been identified. These motifs have been suggested to be critical for the structural integrity of the receptor, as well as for coupling to G proteins.

[0037] The most conserved parts of these GPCR Subfamily I proteins are the transmembrane regions and the first two cytoplasmic loops. A conserved arginine-aromatic doublet is present in the N-terminal extremity of the second cytoplasmic loop and is implicated in the interaction with G proteins.

[0038] The human 93870 polypeptide also contains a receptor coupled G-protein receptor transmembrane domain derived from ProDom PD000009 (Release 2000.1; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>.) located at about amino acid residues 56-123 of SEQ ID NO:2. To identify the presence of a "receptor coupled G-protein transmembrane" domain in a 93870 protein sequence, and make the determination that a polypeptide or protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein can be aligned against a database of 1308 family members (using BLASTP 2.0a19MP-WashU (05 Feb-1998)). Sequences containing high scoring segment pairs are reported from ProDom. As used herein, the term "receptor coupled G-protein transmembrane domain" includes an amino acid sequence of about 25-125 amino acid residues in length, preferably about 50-100 amino acids, more preferably about 60-80 amino acids, or about 67 amino acids and has a bit score for the alignment of the sequence to the receptor coupled G-protein transmembrane domain of at least about 50, preferably about 100, or more preferably

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-10-

about 125 or greater, and an E-value of about 3.7×10^{-6} or less, more preferably about 3.7×10^{-7} or less, and most preferably about 3.7×10^{-8} or less.

- [0039]** For further identification of a 93870 protein sequence as a G-protein coupled receptor, the amino acid sequence of the protein was searched against a database of domains, e.g., the ProDom database (Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). The ProDom protein domain database consists of an automatic compilation of homologous domains. Current versions of ProDom are built using recursive PSI-BLAST searches (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340) of the SWISS-PROT 38 and TREMBL protein databases. The database automatically generates a consensus sequence for each domain. A BLAST search was performed against the HMM database yielding a consensus amino acid sequence for a GPCR derived from ProDom PD000009 (Release 2000.1; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>). The consensus amino acid sequence from PD000009 is amino acids 56 to 123 of a murine GPCR, SWISS-PROT:P51676 (SEQ ID NO:5). For additional identification of the 93870 protein sequence as a GPCR, the full murine amino acid sequence for the GPCR derived from ProDom PD000009 (Release 2000.1; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>) is depicted as SEQ ID NO:4 and represents amino acids 1 to 356 of SWISS-PROT:P51676. An alignment of the 93870 protein with SWISS-PROT:P51676 (SEQ ID NO:5) demonstrates about 21% sequence identity between the two sequences (as calculated in matblas from the blosum62.ijj matrix).
- [0040]** The receptor coupled G-protein transmembrane domain has been assigned the ProDom Accession Number PD000009 (Release 2000.1; <http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/cgi-bin/NewBlastProdomII>). The receptor coupled G-protein transmembrane domain in 93870 as predicted by ProDom has a bit score of 141, and the E-value of 3.7×10^{-9} . A top scoring alignment of the receptor coupled G-protein transmembrane domain (amino acids 56 to 123 of SEQ ID NO:2) of human 93870 against a murine amino acid sequence is depicted as (SEQ ID NO:5).
- [0041]** The receptor coupled G- protein domain typically has the following consensus sequence:
- [0042]** [GSTALIVMFYWC]-[GSTANCPDE]-{EDPKRH}-x(2)-[LIVMNQGA]-x(2)-[LIVMFT]-[GSTANC]-[LIVMFYWSTAC]-[DENH]-R-[FYWCSH]-x(2)-[LIVM] (SEQ ID NO:6).
- [0043]** This consensus sequence is located at amino acid residues 109 to 125 of SEQ ID NO:2. In this consensus sequence pattern, each element in the pattern is separated by a dash

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-11-

(-); square [] brackets indicate the particular residues that are accepted at that position; x indicates any residue is accepted at that position; a whole number in parenthesis following an x indicates any amino acid repetition of a particular element is accepted for that specified number of residues i.e. x(2); { } brackets indicate that the particular amino acid in that position can be any except those enclosed in the bracket.

5 [0044] The 93870 polypeptide of the invention contains a portion of the receptor coupled G-protein domain representing 76% of the receptor coupled G-protein receptor consensus pattern described in PROSITE pattern PDOC00210 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00210>). The receptor coupled G-protein consensus pattern of the 93870 polypeptide differs at amino acid residues 114, 118, 120 and 125 of SEQ ID NO:2, wherein a "Y" is substituted for any of the "LIVMNQGA" residues at amino acid residue 114 of SEQ ID NO:2, a "L" is substituted for any of the "GSTANC" residues at amino acid residue 118 of SEQ ID NO:2, a "T" is substituted for any of the "DENH" residues at amino acid residue 120 of SEQ ID NO:2, and a "F" is substituted for any of the "LIVM" residues at amino acid residue 125 of SEQ ID NO:2.

15 [0045] The human 93870 protein has two N-glycosylation sites (Prosite Pattern Number PS00001) at about amino acid residues 13-16 and 17-20 of SEQ ID NO:2; two protein kinase C phosphorylation sites (Prosite Pattern Number PS00005) at about amino acid residues 14-16 and 267-269 of SEQ ID NO:2; three casein kinase II phosphorylation sites (Prosite Pattern Number PS00006) located at about amino acid residues 18-21, 225-228, and 284-287 of SEQ ID NO:2; one tyrosine kinase phosphorylation site (Prosite Pattern Number PS00007) at about amino acid residues 176-178 of SEQ ID NO:2; three N-myristylation sites (Prosite Pattern Number PS00008) at about amino acid residues 38-43, 92-97, and 305-310 of SEQ ID NO:2.

25 [0046] General information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix domain identification numbers can be found at Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein* 28:405-420 and <http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>.

[0047] Accordingly, in one embodiment of the invention, a 93870 includes at least one, two or three, preferably four, five, or six, and most preferably seven, transmembrane domains and/or at least one, two, preferably three cytoplasmic loops, and/or at least one, two, or preferably three extracellular loops. In another embodiment, the 93870 further includes an N-terminal extracellular domain and/or a C-terminal cytoplasmic domain. In another embodiment, the 93870 can include seven transmembrane domains, three cytoplasmic loops,

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-12-

three extracellular loops and can further include an N-terminal extracellular domain and/or a C-terminal cytoplasmic domain.

[0048] The 93870 molecules of the present invention can further include at least one N-glycosylation site. The 93870 molecule can have one, preferably two protein kinase C phosphorylation sites. The 93870 molecules can include at least one, two, preferably three casein kinase II phosphorylation sites. The 93870 molecules can have at least one tyrosine kinase phosphorylation site. The 93870 molecules can additionally include at least one, two, preferably three N-myristylation sites.

[0049] As the 93870 polypeptides of the invention may modulate 93870 activities, they may be useful for developing novel diagnostic and therapeutic agents for 93870-mediated or related disorders, as described below.

[0050] As used herein, a "93870 activity", "biological activity of 93870" or "functional activity of 93870", refers to an activity exerted by a 93870 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on e.g., a 93870-responsive cell or on a 93870 substrate, e.g., a protein substrate, as determined *in vivo* or *in vitro*. In one embodiment, a 93870 activity is a direct activity, such as an association with a 93870 target molecule. A "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a 93870 protein binds or interacts in nature. In an exemplary embodiment, is a 93870 ligand. A 93870 activity can also be an indirect activity, e.g., a cellular signaling activity mediated by interaction of the 93870 protein with a 93870 ligand.

[0051] Based on the above-described sequence similarities, the 93870 molecules of the present invention are predicted to have similar biological activities as those of the G-protein coupled receptor Subfamily I members. For example, the 93870 protein of the present invention is has one more of the following activities: (1) the ability to regulate, sense, and/or transmitting an extracellular signal into a cell, for example, an osteoblast, neutrophil, megakaryocyte, or bone marrow mononuclear cell; (2) the ability to interact with (e.g., bind to) an extracellular signal or a cell surface receptor; (3) the ability to mobilize an intracellular molecule that participates in a signal transduction pathway (e.g., adenylate cyclase or phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)); (5) the ability to control production or secretion of molecules; (6) the ability to alter the structure of a cellular component; (7) the ability to modulate cell proliferation, e.g., synthesis of DNA; and (8) the ability to modulate cell growth, migration, differentiation, survival, and/or function e.g., of the cells or tissue in which they are expressed (e.g., bone marrow mononuclear cells, (e.g., granulocytes (e.g., neutrophils), osteoblasts, and megakaryocytes). (9) the ability to modulate

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-13-

the synthesis of organic components of bone matrix (type I collagen, proteoglycans, and glycoproteins) by osteoblasts; (10) the ability to sense and mediate cellular response to environmental stimuli, (e.g., small molecules, protein ligands); (11) the ability to sense and mediate cellular response to biological messengers, (e.g., secreted hormones); and (12) the ability to signal through G proteins. Thus, the 93870 molecules can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling GPCR associated disorders.

[0052] The response mediated by a 93870 receptor protein depends on the type of cell in which it is expressed. For example, in some cells, binding of a ligand to the receptor protein may stimulate an activity such as release of compounds, gating of a channel, cellular adhesion, migration, differentiation, etc., through phosphatidylinositol or cyclic AMP metabolism and turnover while in other cells, the binding of the ligand will produce a different result. Regardless of the cellular activity/response modulated by the receptor protein, it is universal that the protein is a GPCR and interacts with G proteins to produce one or more secondary signals, in a variety of intracellular signal transduction pathways, e.g., through phosphatidylinositol or cyclic AMP metabolism and turnover, in a cell. As used herein, a "signaling transduction pathway" refers to the modulation (e.g., stimulation or inhibition) of a cellular function/activity upon the binding of a ligand to the GPCR (93870 protein). Examples of such functions include mobilization of intracellular molecules that participate in a signal transduction pathway, e.g., phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) and adenylate cyclase.

[0053] As used herein, "phosphatidylinositol turnover and metabolism" refers to the molecules involved in the turnover and metabolism of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) as well as to the activities of these molecules. PIP₂ is a phospholipid found in the cytosolic leaflet of the plasma membrane. Binding of ligand to the receptor activates, in some cells, the plasma-membrane enzyme phospholipase C that in turn can hydrolyze PIP₂ to produce 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Once formed IP₃ can diffuse to the endoplasmic reticulum surface where it can bind an IP₃ receptor, e.g., a calcium channel protein containing an IP₃ binding site. IP₃ binding can induce opening of the channel, allowing calcium ions to be released into the cytoplasm. IP₃ can also be phosphorylated by a specific kinase to form inositol 1,3,4,5-tetraphosphate (IP₄), a molecule which can cause calcium entry into the cytoplasm from the extracellular medium. IP₃ and IP₄ can subsequently be hydrolyzed very rapidly to the inactive products inositol 1,4-bisphosphate (IP₂) and inositol 1,3,4-triphosphate, respectively. These inactive products can be recycled by the cell and used to synthesize PIP₂. The other second messenger produced by the hydrolysis of PIP₂, namely

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-14-

1,2-diacylglycerol (DAG), remains in the cell membrane where it can serve to activate the enzyme protein kinase C. Protein kinase C is usually found soluble in the cytoplasm of the cell, but upon an increase in the intracellular calcium concentration, this enzyme can move to the plasma membrane where it may be activated by DAG. The activation of protein kinase C in different cells results in various cellular responses such as the phosphorylation of glycogen synthase, or the phosphorylation of various transcription factors, e.g., NF- κ B. The language "phosphatidylinositol activity", as used herein, refers to an activity of PIP₂ or one of its metabolites.

[0054] Another signaling pathway in which the receptor may participate is the cAMP turnover pathway. As used herein, "cyclic AMP turnover and metabolism" refers to the molecules involved in the turnover and metabolism of cyclic AMP (cAMP) as well as to the activities of these molecules. Cyclic AMP is a second messenger produced in response to ligand-induced stimulation of certain G protein coupled receptors. In the cAMP signaling pathway, binding of a ligand to a GPCR can lead to the activation of the enzyme adenylyl cyclase, which catalyzes the synthesis of cAMP. The newly synthesized cAMP can in turn activate a cAMP-dependent protein kinase. This activated kinase can phosphorylate a voltage-gated potassium channel protein, or an associated protein, and lead to the inability of the potassium channel to open during an action potential. The inability of the potassium channel to open results in a decrease in the outward flow of potassium, which normally repolarizes the membrane of a neuron, leading to prolonged membrane depolarization.

[0055] The 93870 molecules and modulators thereof can act as novel therapeutic agents for controlling one or more of GPCR associated disorders, e.g., immune and inflammatory disorders, platelet disorders, skeletal or bone metabolism disorders, and bone marrow mononuclear cell disorders, as described herein.

[0056] GPCR-associated disorders can include immune and inflammatory diseases (including, for example, diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease and ulcerative colitis), aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, respiratory inflammation (e.g., asthma, allergic asthma, and chronic obstructive pulmonary disease), cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis, acute necrotizing

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-15-

hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polyarthritides, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, and interstitial lung fibrosis), graft-versus-host disease, cases of transplantation, respiratory inflammation (consisting of asthma and chronic obstructive pulmonary diseases) and allergy such as, atopic allergy. Other examples of GPCR associated immune and inflammatory disorders are congenital X-linked infantile hypogammaglobulinemia, transient hypogammaglobulinemia, common variable immunodeficiency, selective IgA deficiency, chronic mucocutaneous candidiasis, or severe combined immunodeficiency.

[0057] Blood platelet disorders include, but are not limited to, thrombocytopenia due to a reduced number of megakaryocytes in the bone marrow, for example, as a result of chemotherapy; invasive disorders, such as leukemia, idiopathic or drug- or toxin-induced aplasia of the marrow, or rare hereditary amegakaryocytic thrombocytopenias; ineffective thrombopoiesis, for example, as a result of megaloblastic anemia, alcohol toxicity, vitamin B12 or folate deficiency, myelodysplastic disorders, or rare hereditary disorders (e.g., Wiskott-Aldrich syndrome and May-hegglin anomaly); a reduction in platelet distribution, for example, as a result of cirrhosis, a splenic invasive disease (e.g., Gaucher's disease), or myelofibrosis with extramedullary myeloid metaplasia; increased platelet destruction, for example, as a result of removal of IgG-coated platelets by the mononuclear phagocytic system (e.g., idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), secondary immune thrombocytopenia (e.g., systemic lupus erythematosus, lymphoma, or chronic lymphocytic leukemia), drug-related immune thrombocytopenias (e.g., as with quinidine, aspirin, and heparin), post-transfusion purpura, and neonatal thrombocytopenia as a result of maternal platelet autoantibodies or maternal platelet alloantibodies). Also included are thrombocytopenia secondary to intravascular clotting and thrombin induced damage to platelets as a result of, for example, obstetric complications, metastatic tumors, severe gram-negative bacteremia, thrombotic thrombocytopenic purpura, or severe illness. Also included is dilutional thrombocytopenia, for example, due to massive hemorrhage. Blood platelet disorders also include, but are not limited to, essential thrombocytosis and thrombocytosis associated with, for example, splenectomy, acute or chronic inflammatory diseases, hemolytic anemia, carcinoma, Hodgkin's disease, lymphoproliferative disorders, and malignant lymphomas.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-16-

[0058] Aberrant expression and/or activity of 93870 molecules can mediate disorders associated with skeletal integrity or bone metabolism. "Skeletal integrity" refers to direct or indirect effects on the formation or maintenance of bones or joints and the tissues, such as ligaments, tendons or muscles which connect and control movement of those structures.

5 "Bone metabolism" refers to direct or indirect effects in the formation or degeneration of bone structures, e.g., bone formation, bone resorption, etc., which may ultimately affect the structural integrity of bones or the concentrations in serum of calcium and phosphate. This term also includes activities mediated by 93870 molecule effects in bone cells, e.g. osteoclasts and osteoblasts, that may in turn result in bone formation and degeneration. These
10 cells are responsible for the synthesis and remodeling of the collagenous bone matrix, among other activities. Collagen is the main structural component of bone and bone-associated skeletal structures beside calcium phosphate, so collagen synthesis and processing are integral to bone or skeletal structure. 93870 molecules can be involved in one or more of the steps which result in the correct collagen matrix for bone. In another example, 93870
15 molecules can support different activities of bone resorbing osteoclasts such as the stimulation of differentiation of monocytes and mononuclear phagocytes into osteoclasts. Accordingly, 93870 molecules that modulate the production of bone cells can influence bone formation and degeneration, and thus can be used to treat skeletal or bone disorders. Examples of such disorders include, but are not limited to, osteogenesis imperfecta,
20 osteoporosis, osteodystrophy, osteomalacia, rickets, osteitis fibrosa cystica, Ehlers-Danlos syndrome, renal osteodystrophy, osteosclerosis, anti-convulsant treatment, osteopenia, fibrogenesis-imperfecta ossium, secondary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism, hyperparathyroidism, cirrhosis, obstructive jaundice, drug induced metabolism, medullary carcinoma, chronic renal disease, rickets, sarcoidosis, glucocorticoid antagonism,
25 malabsorption syndrome, steatorrhea, tropical sprue, idiopathic hypercalcemia and milk fever.

[0059] The 93870 protein, fragments thereof, and derivatives and other variants of the sequence in SEQ ID NO:2 thereof are collectively referred to as "polypeptides or proteins of the invention" or "93870 polypeptides or proteins". Nucleic acid molecules encoding such
30 polypeptides or proteins are collectively referred to as "nucleic acids of the invention" or "93870 nucleic acids."

[0060] As used herein, the term "nucleic acid molecule" includes DNA molecules (e.g., a cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (e.g., an mRNA) and analogs of the DNA or

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-17-

RNA generated, e.g., by the use of nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

[0061] The term "isolated or purified nucleic acid molecule" includes nucleic acid molecules which are separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. For example, with regards to genomic DNA, the term "isolated" includes nucleic acid molecules which are separated from the chromosome with which the genomic DNA is naturally associated. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and/or 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of 5' and/or 3' nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

[0062] As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" describes conditions for hybridization and washing. Stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. A preferred, example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 50°C. Another example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 55°C. A further example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C. Preferably, stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Particularly preferred stringency conditions (and the conditions that should be used if the practitioner is uncertain about what conditions should be applied to determine if a molecule is within a hybridization limitation of the invention) are 0.5M Sodium Phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-18-

at 65°C. Preferably, an isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, corresponds to a naturally-occurring nucleic acid molecule.

5 [0063] As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (e.g., encodes a natural protein).

[0064] As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules which include an open reading frame encoding a 93870 protein, preferably a mammalian 93870 protein, and can further include non-coding regulatory sequences, and
10 introns.

[0065] An "isolated" or "purified" polypeptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. In one embodiment, the language "substantially free" means preparation of
15 93870 protein having less than about 30%, 20%, 10% and more preferably 5% (by dry weight), of non-93870 protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), or of chemical precursors or non-93870 chemicals. When the 93870 protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about
20 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation. The invention includes isolated or purified preparations of at least 0.01, 0.1, 1.0, and 10 milligrams in dry weight.

[0066] A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of 93870 (e.g., the sequence of SEQ ID NO:1 or 3, or the nucleotide
25 sequence of the DNA insert of the plasmid deposited with ATCC as Accession Number _____) without abolishing or more preferably, without substantially altering a biological activity, whereas an "essential" amino acid residue results in such a change. For example, amino acid residues that are conserved among the polypeptides of the present invention, e.g., those present in the seven transmembrane receptor domains, are predicted to be particularly
30 unamenable to alteration.

[0067] A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-19-

acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan,

5 histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 93870 protein is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a 93870 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 93870 biological activity to identify mutants that retain activity. Following
10 mutagenesis of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or the nucleotide sequence of the DNA insert of the plasmid deposited with ATCC as Accession Number _____, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined.

[0068] As used herein, a "biologically active portion" of a 93870 protein includes a
15 fragment of a 93870 protein which participates in an interaction between a 93870 molecule and a non-93870 molecule. Biologically active portions of a 93870 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the 93870 protein, e.g., the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include less amino acids than the full length 93870 proteins, and exhibit at least one activity of a 93870 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at
20 least one activity of the 93870 protein, e.g., a domain or motif capable of regulating, sensing and/or transmitting an extracellular signal into a cell, for example, a hematopoietic cell; a domain or motif capable of interacting with (e.g., binding to) an extracellular signal or a cell surface receptor; a domain or motif capable of mobilizing an intracellular molecule that participates in a signal transduction pathway (e.g., adenylate cyclase or phosphatidylinositol
25 4,5-bisphosphate (PIP₂), inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)); a domain or motif capable of regulating polarization of the plasma membrane; a domain or motif capable of controlling production or secretion of molecules; a domain or motif capable of altering the structure of a cellular component; a domain or motif capable of modulating cell proliferation, e.g., synthesis of DNA; and/or a domain or motif capable of modulating migration, proliferation
30 and/or differentiation of a cell.

[0069] A biologically active portion of a 93870 protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100, 200 or more amino acids in length. Biologically active portions of a 93870 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 93870 mediated activity, e.g., a biological activity described herein.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-20-

[0070] Calculations of homology or sequence identity (the terms "homology and identity" are used interchangeably herein) between sequences are performed as follows.

[0071] To determine the percent identity of two amino acid sequences, or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence (e.g., when aligning a second sequence to the 93870 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 313 amino acid residues, at least 94, preferably at least 125, more preferably at least 157, even more preferably at least 189, and even more preferably at least 219, 250, 282, or 313 amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

[0072] The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. A particularly preferred set of parameters (and the one that should be used if the practitioner is uncertain about what parameters should be applied to determine if a molecule is within a sequence

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-21-

identity or homology limitation of the invention) are a Blossum 62 scoring matrix with a gap penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5.

[0073] The percent identity between two amino acid or nucleotide sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

[0074] The nucleic acid and protein sequences described herein can be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify other family members or related sequences. Such searches can be performed using the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) of Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to 93870 nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to 93870 protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

[0075] "Misexpression or aberrant expression", as used herein, refers to a non-wild type pattern of gene expression, at the RNA or protein level. It includes: expression at non-wild type levels, i.e., over or under expression; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the time or stage at which the gene is expressed, e.g., increased or decreased expression (as compared with wild type) at a predetermined developmental period or stage; a pattern of expression that differs from wild type in terms of decreased expression (as compared with wild type) in a predetermined cell type or tissue type; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the splicing size, amino acid sequence, post-translational modification, or biological activity of the expressed polypeptide; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the effect of an environmental stimulus or extracellular stimulus on expression of the gene, e.g., a pattern of increased or decreased expression (as compared with wild type) in the presence of an increase or decrease in the strength of the stimulus.

[0076] "Subject", as used herein, can refer to a mammal, e.g., a human, or to an experimental or animal or disease model. The subject can also be a non-human animal, e.g., a horse, cow, goat, or other domestic animal.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-22-

[0077] A "purified preparation of cells", as used herein, refers to, in the case of plant or animal cells, an in vitro preparation of cells and not an entire intact plant or animal. In the case of cultured cells or microbial cells, it consists of a preparation of at least 10% and more preferably 50% of the subject cells.

5 [0078] Various aspects of the invention are described in further detail below.

Isolated Nucleic Acid Molecules

[0079] In one aspect, the invention provides an isolated or purified nucleic acid molecule that encodes a 93870 polypeptide described herein, e.g., a full-length 93870 protein or a
10 fragment thereof, e.g., a biologically active portion of 93870 protein. Also included is a nucleic acid fragment suitable for use as a hybridization probe, which can be used, e.g., to identify nucleic acid molecule encoding a polypeptide of the invention, 93870 mRNA, and fragments suitable for use as primers, e.g., PCR primers for the amplification or mutation of nucleic acid molecules.

[0080] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, or the deposited nucleotide sequence, or a portion of either of these nucleotide sequences. In one embodiment, the nucleic acid molecule includes sequences encoding the human 93870 protein (i.e., "the coding region," from
15 nucleotides 147-1085 of SEQ ID NO:1), as well as 5'-untranslated sequences (nucleotides 1-146 of SEQ ID NO:1) or 3'-untranslated sequences (nucleotides 1086-1684 of SEQ ID NO:1). Alternatively, the nucleic acid molecule can include only the coding region of SEQ ID NO:1 (e.g., nucleotides 147-1085 of SEQ ID NO:1, corresponding to nucleotides 1-939
20 SEQ ID NO:3) and, e.g., no flanking sequences which normally accompany the subject sequence. In another embodiment, the nucleic acid molecule encodes a sequence
25 corresponding to the 313 amino acid residue protein of SEQ ID NO:2.

[0081] In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes a nucleic acid molecule which is a complement of the nucleotide sequence shown in one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, the deposited nucleotide sequence, or a portion of any of these sequences. In other embodiments, the nucleic acid molecule of the invention is
30 sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence that it can hybridize with a nucleic acid having that sequence, thereby forming a stable duplex.

[0082] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes a nucleotide sequence which is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-23-

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% or more homologous to the entire length of the nucleotide sequence shown in one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, the deposited nucleotide sequence, and a portion, preferably of the same length, of any of these nucleotide sequences.

5

93870 Nucleic Acid Fragments

[0083] A nucleic acid molecule of the invention can include only a portion of the nucleic acid sequence of one of SEQ ID NOs:1 and 3 and the deposited nucleotide sequence. For example, such a nucleic acid molecule can include a fragment that can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 93870 protein, e.g., an immunogenic or biologically active portion of a 93870 protein. A fragment can comprise nucleotides encoding a fragment corresponding to residues 56-123 of SEQ ID NO:2, which is a receptor coupled G-protein transmembrane domain of human 93870. The nucleotide sequence determined from the cloning of the 93870 gene facilitates generation of probes and primers for use in identifying and/or cloning other 93870 family members, or fragments thereof, as well as 93870 homologues, or fragments thereof, from other species.

[0084] In another embodiment, a nucleic acid includes a nucleotide sequence that includes part, or all, of the coding region and extends into either (or both) the 5'- or 3'-non-coding region. Other embodiments include a fragment that includes a nucleotide sequence encoding an amino acid fragment described herein. Nucleic acid fragments can encode a specific domain or site described herein or fragments thereof, particularly fragments thereof that are at least about 263, 265, 270, 275, 280, or more amino acids in length. Fragments also include nucleic acid sequences corresponding to specific amino acid sequences described above or fragments thereof. Nucleic acid fragments should not be construed as encompassing those fragments that may have been disclosed prior to the invention.

[0085] A nucleic acid fragment can include a sequence corresponding to a domain, region, or functional site described herein. A nucleic acid fragment can also include one or more domain, region, or functional site described herein.

[0086] 93870 probes and primers are provided. Typically a probe/primer is an isolated or purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically includes a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 7, 12 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 75 consecutive nucleotides of a sense or antisense sequence of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, the

30

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-24-

deposited nucleotide sequence, and a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, or the deposited nucleotide sequence.

5 **[0087]** In a preferred embodiment the nucleic acid is a probe which is at least 5 or 10, and less than 200, more preferably less than 100, or less than 50, base pairs in length. It should be identical, or differ by 1, or fewer than 5 or 10 bases, from a sequence disclosed herein. If alignment is needed for this comparison the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

10 **[0088]** A probe or primer can be derived from the sense or anti-sense strand of a nucleic acid that encodes, for example, an receptor coupled G-protein transmembrane domain at about amino acid residues 56 to 123 of SEQ ID NO:2

15 **[0089]** In another embodiment a set of primers is provided, e.g., primers suitable for use in a PCR, which can be used to amplify a selected region of a 93870 sequence. The primers should be at least 5, 10, or 50 base pairs in length and less than 100- 200, base pairs in length. The primers should be identical, or differs by one base from a sequence disclosed herein or from a naturally occurring variant. Primers suitable for amplifying all or a portion of any of the following regions of a receptor coupled G-protein transmembrane domain are provided: for example, any of the transmembrane domains of the 93870 polypeptide (i.e., amino acid residues 28-51, 58-79, 98-119, 140-160, 192-216, 236-252, and 276-299 of SEQ ID NO:2), 20 or any of the extracellular domains of the 93870 polypeptide (i.e., amino acid residues 80-97, 161-191, and 253-275) of SEQ ID NO:2, or any of the the intracellular domains of the 93870 polypeptide (i.e., amino acid residues 52-59, 120-139, and 217-235) of SEQ ID NO:2.

25 **[0090]** A nucleic acid fragment can encode an epitope bearing region of a polypeptide described herein.

[0091] A nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of a 93870 polypeptide" can be prepared by isolating a portion of the nucleotide sequence of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence, which encodes a polypeptide having a 93870 biological activity (e.g., the biological activities of the 93870 proteins as described herein), expressing the encoded portion of the 93870 protein (e.g., by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of the 93870 protein. 30 For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of 93870 can include a receptor coupled G-protein transmembrane domain, e.g., amino acid residues 56 to 123 of SEQ ID NO:2. A nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-25-

93870 polypeptide can comprise a nucleotide sequence that is greater than 25 or more nucleotides in length.

[0092] In one embodiment, a nucleic acid includes a nucleotide sequence which is greater than 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 750, 800, 850, 900, or more nucleotides in length and that hybridizes under stringent hybridization conditions with a nucleic acid molecule having the sequence of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence.

93870 Nucleic Acid Variants

10 [0093] The invention further encompasses nucleic acid molecules having a sequence that differs from the nucleotide sequence shown in one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence. Such differences can be attributable to degeneracy of the genetic code (i.e., differences which result in a nucleic acid that encodes the same 93870 proteins as those encoded by the nucleotide sequence disclosed herein). In another
15 embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention encodes a protein having an amino acid sequence which differs by at least 1, but by fewer than 5, 10, 20, 50, or 100, amino acid residues from SEQ ID NO:2. If alignment is needed for this comparison the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

20 [0094] Nucleic acids of the invention can be chosen for having codons, which are preferred, or non-preferred, for a particular expression system. For example, the nucleic acid can be one in which at least one codon, preferably at least 10%, or 20% of the codons has been altered such that the sequence is optimized for expression in *E. coli*, yeast, human, insect, or CHO cells.

25 [0095] Nucleic acid variants can be naturally occurring, such as allelic variants (same locus), homologs (different locus), and orthologs (different organism), or can be non-naturally occurring. Non-naturally occurring variants can be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells, or organisms. The variants can contain nucleotide substitutions, deletions, inversions and insertions. Variation can occur in
30 either or both the coding and non-coding regions. The variations can produce both conservative and non-conservative amino acid substitutions (as compared in the encoded product).

[0096] In a preferred embodiment, the nucleic acid has a sequence that differs from that of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence, e.g., as

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-26-

follows: by at least one, but fewer than 10, 20, 30, or 40, nucleotide residues; or by at least one but fewer than 1%, 5%, 10% or 20% of the nucleotide residues in the subject nucleic acid. If necessary for this analysis, the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

5
10
15
[0097] Orthologs, homologs, and allelic variants can be identified using methods known in the art. These variants comprise a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is 50%, at least about 55%, typically at least about 70-75%, more typically at least about 80-85%, and most typically at least about 90-95% or more identical to the nucleotide sequence shown in one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, the deposited nucleotide sequence, or a fragment of one of these sequences. Such nucleic acid molecules can readily be identified as being able to hybridize under stringent conditions to the nucleotide sequence of one of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, the deposited nucleotide sequence, or a fragment of one of these sequences. Nucleic acid molecules corresponding to orthologs, homologs, and allelic variants of the 93870 cDNAs of the invention can further be isolated by mapping to the same chromosome or locus as the 93870 gene.

[0098] Preferred variants include those that are correlated with any of the 93870 biological activities described herein, e.g., transducing a chemical or protein signal via a G-protein coupled receptor.

20
[0099] Allelic variants of 93870 (e.g., human 93870) include both functional and non-functional proteins. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the 93870 protein within a population that maintain the ability to mediate any of the 93870 biological activities described herein.

25
30
[00100] Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO:2, or substitution, deletion or insertion of non-critical residues in non-critical regions of the protein. Non-functional allelic variants are naturally-occurring amino acid sequence variants of the 93870 (e.g., human 93870) protein within a population that do not have the ability to mediate any of the 93870 biological activities described herein. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, a deletion, or insertion, or premature truncation of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a substitution, insertion, or deletion in critical residues or critical regions of the protein.

[00101] Moreover, nucleic acid molecules encoding other 93870 family members and, thus, which have a nucleotide sequence which differs from the 93870 sequences of one of

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-27-

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, and the deposited nucleotide sequence are within the scope of the invention.

Antisense Nucleic Acid Molecules, Ribozymes and Modified 93870 Nucleic Acid Molecules

5 **[00102]** In another aspect, the invention features, an isolated nucleic acid molecule that is antisense to 93870. An "antisense" nucleic acid can include a nucleotide sequence that is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA
10 sequence. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 93870 coding strand, or to only a portion thereof (e.g., the coding region of human 93870 corresponding to SEQ ID NO:3). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "non-coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding 93870 (e.g., the 5'- and 3'-untranslated regions).

[00103] An antisense nucleic acid can be designed such that it is complementary to the
15 entire coding region of 93870 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or non-coding region of 93870 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 93870 mRNA, e.g., between the -10 and +10 regions of the target gene nucleotide sequence of interest. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 7, 10, 15, 20,
20 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, or 80 or more nucleotide residues in length.

[00104] An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (e.g., an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase
25 the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids, e.g., phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. The antisense nucleic acid also can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been sub-cloned in an antisense orientation (i.e., RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an
30 antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

[00105] The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject (e.g., by direct injection at a tissue site), or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a 93870 protein to thereby

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-28-

inhibit expression of the protein, e.g., by inhibiting transcription and/or translation.

Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, e.g., by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies that bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of the antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

10 **[00106]** In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an alpha-anomeric nucleic acid molecule. An alpha-anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual beta-units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucl. Acids. Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucl. Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

15 **[00107]** In still another embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. A ribozyme having specificity for a 93870-encoding nucleic acid can include one or more sequences complementary to the nucleotide sequence of a 93870 cDNA disclosed herein (i.e., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3), and a sequence having known catalytic sequence responsible for mRNA cleavage (see, for example, U.S. Patent number 5,093,246 or Haselhoff *et al.* (1988, *Nature* 334:585-591). For example, a derivative of a Tetrahymena L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a 93870-encoding mRNA (e.g., U.S. Patent number 4,987,071; and U.S. Patent number 5,116,742). Alternatively, 93870 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules (e.g., Bartel *et al.* (1993) *Science* 261:1411-1418).

20 **[00108]** 93870 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 93870 (e.g., the 93870 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 93870 gene in target cells (Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6:569-584; Helene, *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; Maher (1992) *Bioassays* 14:807-815). The potential sequences that can be targeted for triple helix formation can be increased by creating a so-called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5' to 3', 3' to 5'

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-29-

manner, such that they hybridize with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

[00109] The invention also provides detectably labeled oligonucleotide primer and probe molecules. Typically, such labels are chemiluminescent, fluorescent, radioactive, or colorimetric.

[00110] A 93870 nucleic acid molecule can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (Hyrup *et al.* (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4:5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acid" (PNA) refers to a nucleic acid mimic, e.g., a DNA mimic, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of a PNA can allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-14675.

[00111] PNAs of 93870 nucleic acid molecules can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or anti-gene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of 93870 nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (e.g., by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used in combination with other enzymes, (e.g., S1 nucleases, as described in Hyrup *et al.* (1996) *supra*; or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe, *supra*).

[00112] In other embodiments, the oligonucleotide can include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (e.g., Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT publication number WO 88/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT publication number WO 89/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (e.g., Krol *et al.* (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) or intercalating agents (e.g., Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5:539-549). To this end, the oligonucleotide can be conjugated

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-30-

to another molecule, (e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

[00113] The invention also includes molecular beacon oligonucleotide primer and probe molecules having at least one region which is complementary to a 93870 nucleic acid of the invention, two complementary regions, one having a fluorophore and the other having a quencher, such that the molecular beacon is useful for quantitating the presence of the 93870 nucleic acid of the invention in a sample. Molecular beacon nucleic acids are described, for example, in U.S. Patent number 5,854,033, U.S. Patent number 5,866,336, and U.S. Patent number 5,876,930.

Isolated 93870 Polypeptides

[00114] In another aspect, the invention features, an isolated 93870 protein, or fragment, e.g., a biologically active portion, for use as immunogens or antigens to raise or test (or more generally to bind) anti-93870 antibodies. 93870 protein can be isolated from cells or tissue sources using standard protein purification techniques. 93870 protein or fragments thereof can be produced by recombinant DNA techniques or synthesized chemically.

[00115] Polypeptides of the invention include those that arise as a result of the existence of multiple genes, alternative transcription events, alternative RNA splicing events, and alternative translational and post-translational events. The polypeptide can be expressed in systems, e.g., cultured cells, which result in substantially the same post-translational modifications present when the polypeptide is expressed in a native cell, or in systems which result in the alteration or omission of post-translational modifications, e.g., glycosylation or cleavage, present when expressed in a native cell.

[00116] In a preferred embodiment, a 93870 polypeptide has one or more of the following characteristics described in the art (e.g., Strader *et al.*, *supra*, and references cited therein). A preferred embodiment of a 93870 polypeptide also has one or more of the following characteristics:

[00117] it has the ability to regulate, sense and/or transmit an extracellular signal into a cell;

[00118] it has the ability to interact with (e.g., bind to) an extracellular signal or a cell surface receptor;

[00119] it has the ability to mobilize an intracellular molecule that participates in a signal transduction pathway (e.g., adenylate cyclase or phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃));

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-31-

[00120] it has the ability to modulate proliferation, migration, differentiation and/or survival of a cell;

[00121] it has the ability to modulate function, survival, morphology, proliferation and/or differentiation of cells of tissues in which it is expressed e.g. bone marrow mononuclear cells, neutrophils, osteoblasts, and megakaryocytes;

[00122] it has a molecular weight, amino acid composition or other physical characteristic of a 93870 protein of SEQ ID NO:2;

[00123] it has an overall sequence similarity (identity) of at least 60-65%, preferably at least 70%, more preferably at least 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% or more, with a polypeptide of SEQ ID NO:2;

[00124] it has an N-terminal extracellular domain which is preferably about 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more, identical with amino acid residues 1-27 of SEQ ID NO:2;

[00125] it has at least one transmembrane domains which is preferably about 70%, 80%, 90%, 95% or higher, identical with amino acid residues 28-51, 58-79, 98-119, 140-160, 192-216, 236-252, 276-299 of SEQ ID NO:2;

[00126] it has a C-terminal domain which is preferably about 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more, identical with amino acid residues 300-313 of SEQ ID NO:2; or

[00127] it has a motif identical to the arginine-aromatic motif present at amino acids residues about 121-122 of SEQ ID NO:2.

[00128] In a preferred embodiment, the 93870 protein or fragment thereof differs only insubstantially, if at all, from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2. In one embodiment, it differs by at least one, but by fewer than 15, 10 or preferably 5 amino acid residues. In another, it differs from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 by at least one residue but fewer than 20%, 15%, 10% or 5% of the residues differ from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 (if this comparison requires alignment the sequences should be aligned for maximum homology). "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences. The differences are, preferably, differences or changes at a non-essential amino acid residues or involve a conservative substitution of one residue for another. In a preferred embodiment the differences are not in a transmembrane domain, the extracellular domain, or the second cytoplasmic loop of the 93870 protein N-terminal.

[00129] Other embodiments include a protein that has one or more changes in amino acid sequence, relative to SEQ ID NO:2 (e.g., a change in an amino acid residue which is not

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-32-

essential for activity). Such 93870 proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2, yet retain biological activity.

[00130] An expression pattern as follows, based on TaqMan analysis of 93870 expression in at least the following human tissues and cell lines (described below in the

5 Exemplification): high levels of 93870 expression in normal bone marrow mononuclear cells, and neutrophils; lower levels of 93870 expression in human osteoblasts, and megakaryocytes; and

[00131] In one embodiment, the protein includes an amino acid sequence at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or more homologous to SEQ ID NO:2.

10 **[00132]** A 93870 protein or fragment is provided which has an amino acid sequence which varies from SEQ ID NO:2 in one or both of the regions corresponding to, for example residues 120-139 of SEQ ID NO:2 by at least one, but by fewer than 15, 10 or 5 amino acid residues, but which does not differ from SEQ ID NO:2 in the regions corresponding to the transmembrane domain, the N-terminal extracellular domain, or the second cytoplasmic loop
15 of the 93870 protein (if this comparison requires alignment the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences). In some embodiments the difference is at a non-essential residue or is a conservative substitution, while in others the difference is at an essential residue or is a non-conservative substitution.

20 **[00133]** A preferred biologically active portion of a 93870 protein can include at least one or more of the following: An N-terminal extracellular domain, an extracellular loop, and a cytoplasmic loop. Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques (e.g., to create chimeric receptors by replacing an intracellular domain of the 93870 protein with that of a
25 characterized domain of a protein known in the art that initiates a defined signal transduction cascade) and evaluated for one or more of the functional activities of a native 93870 protein.

[00134] In a preferred embodiment, the 93870 protein has the amino acid sequence SEQ ID NO:2. In other embodiments, the 93870 protein is substantially identical to SEQ ID NO:2. In yet another embodiment, the 93870 protein is substantially identical to SEQ ID NO:2 and
30 retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2.

93870 Chimeric or Fusion Proteins

[00135] In another aspect, the invention provides 93870 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 93870 "chimeric protein" or "fusion protein" includes a 93870 polypeptide

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-33-

linked to a non-93870 polypeptide. A "non-93870 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 93870 protein, e.g., a protein which is different from the 93870 protein and which is derived from the same or a different organism. The 93870 polypeptide of the fusion protein can correspond to all or a portion e.g., a fragment described herein of a 93870 amino acid sequence. In a preferred embodiment, a 93870 fusion protein includes at least one or more biologically active portions of a 93870 protein. The non-93870 polypeptide can be fused to the amino or carboxyl terminus of the 93870 polypeptide.

5
10
15
[00136] The fusion protein can include a moiety that has a high affinity for a ligand. For example, the fusion protein can be a GST-93870 fusion protein in which the 93870 sequences are fused to the carboxyl terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 93870. Alternatively, the fusion protein can be a 93870 protein containing a heterologous signal sequence at its amino terminus. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of 93870 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

[00137] Fusion proteins can include all or a part of a serum protein, e.g., a portion of an immunoglobulin (e.g., IgG, IgA, or IgE), e.g., an Fc region and/or the hinge C1 and C2 sequences of an immunoglobulin or human serum albumin.

20
[00138] The 93870 fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 93870 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 93870 substrate. 93870 fusion proteins can be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a 93870 protein; (ii) mis-regulation of the 93870 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 93870 protein.

25
[00139] Moreover, the 93870-fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-93870 antibodies in a subject, to purify 93870 ligands and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of 93870 with a 93870 substrate.

[00140] Expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). A 93870-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 93870 protein.

Variants of 93870 Proteins

30
[00141] In another aspect, the invention also features a variant of a 93870 polypeptide, e.g., which functions as an agonist (mimetics) or as an antagonist. Variants of the 93870

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-34-

proteins can be generated by mutagenesis, e.g., discrete point mutation, the insertion or deletion of sequences or the truncation of a 93870 protein. An agonist of the 93870 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 93870 protein. An antagonist of a 93870 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 93870 protein by, for example, competitively modulating a 93870-mediated activity of a 93870 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. Preferably, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the 93870 protein.

[00142] Variants of a 93870 protein can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, e.g., truncation mutants, of a 93870 protein for agonist or antagonist activity.

[00143] Libraries of fragments e.g., amino-terminal, carboxyl-terminal, or internal fragments, of a 93870 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection of variants of a 93870 protein.

[00144] Variants in which a cysteine residue is added or deleted or in which a residue that is glycosylated is added or deleted are particularly preferred.

[00145] Methods for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify 93870 variants (Arkin *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Eng.* 6:327-331).

[00146] Cell based assays can be exploited to analyze a variegated 93870 library. For example, a library of expression vectors can be transfected into a cell line, e.g., a cell line, which ordinarily responds to 93870 in a substrate-dependent manner. The transfected cells are then contacted with 93870 and the effect of the expression of the mutant on signaling by the 93870 substrate can be detected, e.g., by measuring changes in cell growth and/or enzymatic activity. Plasmid DNA can then be recovered from the cells that score for inhibition, or alternatively, potentiation of signaling by the 93870 substrate, and the individual clones further characterized.

[00147] In another aspect, the invention features a method of making a 93870 polypeptide, e.g., a peptide having a non-wild-type activity, e.g., an antagonist, agonist, or super agonist of

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-35-

a naturally-occurring 93870 polypeptide, e.g., a naturally-occurring 93870 polypeptide. The method includes: altering the sequence of a 93870 polypeptide, e.g., altering the sequence, e.g., by substitution or deletion of one or more residues of a non-conserved region, a domain or residue disclosed herein, and testing the altered polypeptide for the desired activity.

5 **[00148]** In another aspect, the invention features a method of making a fragment or analog of a 93870 polypeptide a biological activity of a naturally occurring 93870 polypeptide. The method includes: altering the sequence, e.g., by substitution or deletion of one or more residues, of a 93870 polypeptide, e.g., altering the sequence of a non-conserved region, or a domain or residue described herein, and testing the altered polypeptide for the desired
10 activity.

Anti-93870 Antibodies

[00149] In another aspect, the invention provides an anti-93870 antibody. The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule or immunologically active
15 portion thereof, i.e., an antigen-binding portion. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include scFV and dcFV fragments, F(ab) and F(ab)₂ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as papain or pepsin respectively.

[00150] The antibody can be a polyclonal, monoclonal, recombinant, e.g., a chimeric,
20 humanized, fully-human, non-human, e.g., murine, or single chain antibody. In a preferred embodiment, it has effector function and can fix complement. The antibody can be coupled to a toxin or imaging agent.

[00151] A full-length 93870 protein or, antigenic peptide fragment of 93870 can be used as an immunogen or can be used to identify anti-93870 antibodies made with other
25 immunogens, e.g., cells, membrane preparations, and the like. The antigenic peptide of 93870 should include at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of 93870. Preferably, the antigenic peptide includes at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid
30 residues.

[00152] Fragments of 93870 which include an extracellular domain or region or a cytoplasmic domain or region as described herein, of SEQ ID NO:2 can be used to make antibodies. Alternatively, a fragment of 93870 which includes a transmembrane domain of SEQ ID NO:2, as described herein, can be used to make an antibody. Figure 1 depicts a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-36-

hydropathy plot of human 93870 which can be used to show areas of hydrophobicity or hydrophilicity, against which other anti-93870 antibodies can be made.

[00153] Antibodies reactive with, or specific or selective for, any of these regions, or other regions or domains described herein are provided.

5 [00154] Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 93870 are located on the surface of the protein, e.g., hydrophilic regions (see Figure 1), as well as regions with high antigenicity. For example, an Emini surface probability analysis of the human 93870 protein sequence can be used to indicate the regions that have a particularly high probability of being localized to the surface of the 93870 protein and are thus likely to
10 constitute surface residues useful for targeting antibody production. In a preferred embodiment the antibody binds an epitope on any domain or region on 93870 proteins described herein.

[00155] In a preferred embodiment the antibody binds an epitope on any domain or region on 93870 proteins described herein.

15 [00156] Chimeric, humanized, but most preferably, completely human antibodies are desirable for applications which include repeated administration, e.g., therapeutic treatment (and some diagnostic applications) of human patients.

[00157] The anti-93870 antibody can be a single chain antibody. A single-chain antibody (scFV) can be engineered as described in for example, Colcher *et al.* (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 880:263-280; and Reiter (1996) *Clin. Cancer Res.* 2:245-252. The single chain antibody
20 can be dimerized or multimerized to generate multivalent antibodies having specificities for different epitopes of the same target 93870 protein.

[00158] In a preferred embodiment, the antibody has reduced or no ability to bind an Fc receptor. For example, it can be an isotype, subtype, fragment or other mutant, which does
25 not support binding to an Fc receptor, e.g., it can have a mutated or deleted Fc receptor binding region.

[00159] An anti-93870 antibody (e.g., monoclonal antibody) can be used to isolate 93870 by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. Moreover, an anti-93870 antibody can be used to detect 93870 protein (e.g., in a cellular lysate or cell
30 supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the protein. Anti-93870 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (i.e., physically linking) the antibody to a detectable substance (i.e., antibody labeling). Examples of detectable substances include

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-37-

various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

10

Recombinant Expression Vectors, Host Cells and Genetically Engineered Cells

[00160] In another aspect, the invention includes, vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a polypeptide described herein. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked and can include a plasmid, cosmid or viral vector. The vector can be capable of autonomous replication or it can integrate into a host DNA. Viral vectors include, e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses.

15

[00161] A vector can include a 93870 nucleic acid in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell. Preferably the recombinant expression vector includes one or more regulatory sequences operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. The term "regulatory sequence" includes promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Regulatory sequences include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence, as well as tissue-specific regulatory and/or inducible sequences. The design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or polypeptides, including fusion proteins or polypeptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., 93870 proteins, mutant forms of 93870 proteins, fusion proteins, and the like).

20

25

30

[00162] The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of 93870 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, polypeptides of the invention can be expressed in *E. coli*, insect cells (e.g., using baculovirus expression vectors), yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel (1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-38-

Diego). Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

[00163] Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith *et al.* (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

[00164] Purified fusion proteins can be used in 93870 activity assays, (e.g., direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 93870 proteins. In a preferred embodiment, a fusion protein expressed in a retroviral expression vector of the present invention can be used to infect bone marrow cells that are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (e.g., six weeks).

[00165] To maximize recombinant protein expression in *E. coli*, the protein is expressed in a host bacterial strain with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, 119-128). Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (Wada *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

[00166] The 93870 expression vector can be a yeast expression vector, a vector for expression in insect cells, e.g., a baculovirus expression vector, or a vector suitable for expression in mammalian cells.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-39-

[00167] When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used viral promoters are derived from polyoma, adenovirus 2, cytomegalovirus and simian virus 40 (SV40).

[00168] In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), lymphoid-specific promoters (Calame *et al.* (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto *et al.* (1989) *EMBO J.* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen *et al.* (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (e.g., the neurofilament promoter; Byrne *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund *et al.* (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (e.g., milk whey promoter; U.S. Patent number 4,873,316 and European Patent Application publication number 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example, the murine hox promoters (Kessel *et al.* (1990) *Science* 249:374-379) and the alpha-fetoprotein promoter (Campes *et al.* (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

[00169] The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. Regulatory sequences (e.g., viral promoters and/or enhancers) operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA in a variety of cell types. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes, see Weintraub, H. *et al.* (1986) *Trends Genet.* 1:Review.

[00170] Another aspect the invention provides a host cell which includes a nucleic acid molecule described herein, e.g., a 93870 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 93870 nucleic acid molecule containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. Such terms refer not only to the particular subject cell, but also to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications can occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are included within the scope of the term as used herein.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-40-

[00171] A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a 93870 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary (CHO) cells) or COS cells. Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

5 [00172] Vector DNA can be introduced into host cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-

10 [00173] A host cell of the invention can be used to produce (i.e., express) a 93870 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a 93870 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method includes culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding a 93870 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 93870 protein is produced. In another

15 embodiment, the method further includes isolating a 93870 protein from the medium or the host cell.

[00174] In another aspect, the invention features, a cell or purified preparation of cells which include a 93870 transgene, or which otherwise mis-express 93870. The cell preparation can consist of human or non-human cells, e.g., rodent cells, e.g., mouse or rat

20 cells, rabbit cells, or pig cells. In preferred embodiments, the cell or cells include a 93870 transgene, e.g., a heterologous form of a 93870, e.g., a gene derived from humans (in the case of a non-human cell). The 93870 transgene can be mal-expressed, e.g., over-expressed or under-expressed. In other preferred embodiments, the cell or cells include a gene that mal-

25 expresses an endogenous 93870, e.g., a gene the expression of which is disrupted, e.g., a knockout. Such cells can serve as a model for studying disorders that are related to mutated or mal-expressed 93870 alleles or for use in drug screening.

[00175] In another aspect, the invention includes, a human cell, e.g., a hematopoietic stem cell, transformed with nucleic acid that encodes a subject 93870 polypeptide.

[00176] Also provided are cells, preferably human cells, e.g., human hematopoietic or

30 fibroblast cells, in which an endogenous 93870 is under the control of a regulatory sequence that does not normally control expression of the endogenous 93870 gene. The expression characteristics of an endogenous gene within a cell, e.g., a cell line or microorganism, can be modified by inserting a heterologous DNA regulatory element into the genome of the cell such that the inserted regulatory element is operably linked to the endogenous 93870 gene.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-41-

For example, an endogenous 93870 gene that is "transcriptionally silent," e.g., not normally expressed, or expressed only at very low levels, can be activated by inserting a regulatory element that is capable of promoting the expression of a normally expressed gene product in that cell. Techniques such as targeted homologous recombination, can be used to insert the heterologous DNA as described (e.g., U.S. Patent number 5,272,071; PCT publication number WO 91/06667).

Transgenic Animals

[00177] The invention provides non-human transgenic animals. Such animals are useful for studying the function and/or activity of a 93870 protein and for identifying and/or evaluating modulators of 93870 activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, and the like. A transgene is exogenous DNA or a rearrangement, e.g., a deletion of endogenous chromosomal DNA, which preferably is integrated into or occurs in the genome of the cells of a transgenic animal. A transgene can direct the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal, other transgenes, e.g., a knockout, reduce expression. Thus, a transgenic animal can be one in which an endogenous 93870 gene has been altered, e.g., by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal (e.g., an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal).

[00178] Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably linked to a transgene of the invention to direct expression of a 93870 protein to particular cells. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of a 93870 transgene in its genome and/or expression of 93870 mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene encoding a 93870 protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

[00179] 93870 proteins or polypeptides can be expressed in transgenic animals or plants, e.g., a nucleic acid encoding the protein or polypeptide can be introduced into the genome of an animal. In preferred embodiments the nucleic acid is placed under the control of a tissue

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-42-

specific promoter, e.g., a milk- or egg-specific promoter, and recovered from the milk or eggs produced by the animal. Suitable animals are mice, pigs, cows, goats, and sheep.

[00180] The invention also includes a population of cells from a transgenic animal, as described herein.

5

Uses

[00181] The nucleic acid molecules, proteins, protein homologues, and antibodies described herein can be used in one or more of the following methods: a) screening assays; b) predictive medicine (e.g., diagnostic assays, prognostic assays, monitoring clinical trials, and pharmacogenetics); and c) methods of treatment (e.g., therapeutic and prophylactic). The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used, for example, to express a 93870 protein (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect a 93870 mRNA (e.g., in a biological sample), to detect a genetic alteration in a 93870 gene and to modulate 93870 activity, as described further below. The 93870 proteins can be used to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of a 93870 substrate or production of 93870 inhibitors. In addition, the 93870 proteins can be used to screen for naturally occurring 93870 substrates, to screen for drugs or compounds which modulate 93870 activity, as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of 93870 protein or production of 93870 protein forms which have decreased, aberrant or unwanted activity compared to 93870 wild-type protein. Exemplary disorders include those in which G- protein coupled receptor activity is aberrant (e.g., congenital stationary night blindness, cardiomyopathy, and familial nephrogenic diabetes insipidus). Moreover, the anti-93870 antibodies of the invention can be used to detect and isolate 93870 proteins, regulate the bioavailability of 93870 proteins, and modulate 93870 activity.

[00182] A method of evaluating a compound for the ability to interact with, e.g., bind to, a subject 93870 polypeptide is provided. The method includes: contacting the compound with the subject 93870 polypeptide; and evaluating the ability of the compound to interact with, e.g., to bind or form a complex with, the subject 93870 polypeptide. This method can be performed *in vitro*, e.g., in a cell free system, or *in vivo*, e.g., in a two-hybrid interaction trap assay. This method can be used to identify naturally-occurring molecules that interact with a subject 93870 polypeptide. It can also be used to find natural or synthetic inhibitors of a subject 93870 polypeptide. Screening methods are discussed in more detail below.

10

15

20

25

30

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-43-

Screening Assays

[00183] The invention provides screening methods (also referred to herein as "assays") for identifying modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., proteins, peptides, peptidomimetics, peptoids, small molecules or other drugs) which bind with 93870 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, 93870 expression or 93870 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, the expression or activity of a 93870 substrate. Compounds thus identified can be used to modulate the activity of target gene products (e.g., 93870 genes) in a therapeutic protocol, to elaborate the biological function of the target gene product, or to identify compounds that disrupt normal target gene interactions.

[00184] In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds that are substrates of a 93870 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof. In another embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds that bind to or modulate the activity of a 93870 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof.

[00185] The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; peptoid libraries (libraries of molecules having the functionalities of peptides, but with a novel, non-peptide backbone which are resistant to enzymatic degradation but which nevertheless remain bioactive; e.g., Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-2685); spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library and peptoid library approaches are limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145).

[00186] Examples of methods for the synthesis of molecular libraries have been described (e.g., DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop *et al.*, (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233).

[00187] Libraries of compounds can be presented in solution (e.g., Houghten, (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993,

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-44-

Nature 364:555-556), bacteria (U.S. Patent number 5,223,409), spores (U.S. Patent number 5,223,409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869), or on phage (Scott *et al.* (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; U.S. Patent number 5,223,409).

[00188] In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 93870 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 93870 activity is determined. Determining the ability of the test compound to modulate 93870 activity can be accomplished by monitoring, for example, changes in enzymatic activity. The cell, for example, can be of mammalian origin.

[00189] The ability of the test compound to modulate 93870 binding to a compound, e.g., a 93870 substrate, or to bind to 93870 can also be evaluated. This can be accomplished, for example, by coupling the compound, e.g., the substrate, with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound, e.g., the substrate, to 93870 can be determined by detecting the labeled compound, e.g., substrate, in a complex. Alternatively, 93870 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 93870 binding to a 93870 substrate in a complex. For example, compounds (e.g., 93870 substrates) can be labeled with ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, or ³H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radio-emission or by scintillation counting. Alternatively, compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

[00190] The ability of a compound (e.g., a 93870 substrate) to interact with 93870 with or without the labeling of any of the interactants can be evaluated. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 93870 without the labeling of either the compound or the 93870 (McConnell *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912). As used herein, a "microphysiometer" (e.g., Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and 93870.

[00191] In yet another embodiment, a cell-free assay is provided in which a 93870 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to the 93870 protein or biologically active portion thereof is evaluated.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-45-

Preferred biologically active portions of the 93870 proteins to be used in assays of the present invention include fragments that participate in interactions with non-93870 molecules, e.g., fragments with high surface probability scores.

5 [00192] Soluble and/or membrane-bound forms of isolated proteins (e.g., 93870 proteins or biologically active portions thereof) can be used in the cell-free assays of the invention. When membrane-bound forms of the protein are used, it can be desirable to utilize a solubilizing agent. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®,

10 Isotridecylpoly(ethylene glycol ether)_n, 3-((3-cholamidopropyl) dimethylamminio)-1-propane sulfonate (CHAPS), 3-((3-cholamidopropyl) dimethylamminio)-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO), or N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate.

[00193] Cell-free assays involve preparing a reaction mixture of the target gene protein and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two

15 components to interact and bind, thus forming a complex that can be removed and/or detected.

[00194] The interaction between two molecules can also be detected, e.g., using fluorescence energy transfer (FET; e.g., U.S. Patent number 5,631,169; U.S. Patent number 4,868,103). A fluorophore label is selected such that a first donor molecule's emitted

20 fluorescent energy will be absorbed by a fluorescent label on a second, 'acceptor' molecule, which in turn is able to fluoresce due to the absorbed energy. Alternately, the 'donor' protein molecule can simply utilize the natural fluorescent energy of tryptophan residues. Labels are chosen that emit different wavelengths of light, such that the 'acceptor' molecule label can be differentiated from that of the 'donor'. Since the efficiency of energy transfer between the

25 labels is related to the distance separating the molecules, the spatial relationship between the molecules can be assessed. In a situation in which binding occurs between the molecules, the fluorescent emission of the 'acceptor' molecule label in the assay should be maximal. An FET binding event can be conveniently measured through standard fluorometric detection means well known in the art (e.g., using a fluorimeter).

30 [00195] In another embodiment, determining the ability of the 93870 protein to bind to a target molecule can be accomplished using real-time biomolecular interaction analysis (BIA; e.g., Sjolander *et al.* (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). "Surface plasmon resonance" (SPR) or "BIA" detects biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (e.g., BIAcore). Changes in

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-46-

the mass at the binding surface (indicative of a binding event) result in alterations of the refractive index of light near the surface (the optical phenomenon of SPR), resulting in a detectable signal that can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

5 [00196] In one embodiment, the target gene product or the test substance is anchored onto a solid phase. The target gene product/test compound complexes anchored on the solid phase can be detected at the end of the reaction. Preferably, the target gene product can be anchored onto a solid surface, and the test compound, (which is not anchored), can be labeled, either directly or indirectly, with detectable labels discussed herein.

10 [00197] It can be desirable to immobilize either 93870, an anti-93870 antibody or its target molecule to facilitate separation of complexed from non-complexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a 93870 protein, or interaction of a 93870 protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for
15 containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/93870 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione Sepharose™ beads (Sigma Chemical, St. Louis,
20 MO) or glutathione-derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or 93870 protein, and the mixture incubated under conditions conducive for complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of
25 beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of 93870 binding or activity determined using standard techniques.

[00198] Other techniques for immobilizing either a 93870 protein or a target molecule on matrices include using conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 93870 protein or
30 target molecules can be prepared from biotin- N-hydroxy-succinimide using techniques known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical).

[00199] In order to conduct the assay, the non-immobilized component is added to the coated surface containing the anchored component. After the reaction is complete, non-

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-47-

reacted components are removed (e.g., by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific for the immobilized component (the antibody, in turn, can be directly labeled or indirectly labeled with, e.g., a labeled anti-Ig antibody).

10 **[00200]** In one embodiment, this assay is performed utilizing antibodies reactive with 93870 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 93870 protein to its target molecule. Such antibodies can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or 93870 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized

15 complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 93870 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the 93870 protein or target molecule.

[00201] Alternatively, cell free assays can be conducted in a liquid phase. In such an assay, the reaction products are separated from non-reacted components, by any of a number

20 of standard techniques, including, but not limited to: differential centrifugation (e.g., Rivas *et al.* (1993) *Trends Biochem. Sci.* 18:284-287); chromatography (e.g., gel filtration chromatography or ion-exchange chromatography); electrophoresis (e.g., Ausubel *et al.* eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York); and immunoprecipitation (e.g., Ausubel, *supra*). Such resins and chromatographic techniques are

25 known to one skilled in the art (e.g., Heegaard, 1998, *J. Mol. Recognit.* 11:141-148; Hage *et al.* (1997) *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 699:499-525). Further, fluorescence energy transfer can also be conveniently utilized, as described herein, to detect binding without further purification of the complex from solution.

[00202] In a preferred embodiment, the assay includes contacting the 93870 protein or

30 biologically active portion thereof with a known compound which binds 93870 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a 93870 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a 93870 protein includes determining the ability of the test

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-48-

compound to preferentially bind to 93870 or biologically active portion thereof, or to modulate the activity of a target molecule, as compared to the known compound.

[00203] The target gene products of the invention can, *in vivo*, interact with one or more cellular or extracellular macromolecules, such as proteins. For the purposes of this

5 discussion, such cellular and extracellular macromolecules are referred to herein as "binding partners." Compounds that disrupt such interactions can be useful in regulating the activity of the target gene product. Such compounds can include, but are not limited to molecules such as antibodies, peptides, and small molecules. The preferred target genes/products for use in this embodiment are the 93870 genes herein identified. In an alternative embodiment, the

10 invention provides methods for determining the ability of the test compound to modulate the activity of a 93870 protein through modulation of the activity of a downstream effector of a 93870 target molecule. For example, the activity of the effector molecule on an appropriate target can be determined, or the binding of the effector to an appropriate target can be determined, as previously described.

15 **[00204]** To identify compounds that interfere with the interaction between the target gene product and its cellular or extracellular binding partner(s), a reaction mixture containing the target gene product and the binding partner is prepared, under conditions and for a time sufficient, to allow the two products to form complex. In order to test an inhibitory agent, the reaction mixture is provided in the presence and absence of the test compound. The test

20 compound can be initially included in the reaction mixture, or can be added at a time subsequent to the addition of the target gene and its cellular or extracellular binding partner. Control reaction mixtures are incubated without the test compound or with a placebo. The formation of any complexes between the target gene product and the cellular or extracellular binding partner is then detected. The formation of a complex in the control reaction, but not

25 in the reaction mixture containing the test compound, indicates that the compound interferes with the interaction of the target gene product and the interactive binding partner. Additionally, complex formation within reaction mixtures containing the test compound and normal target gene product can also be compared to complex formation within reaction mixtures containing the test compound and mutant target gene product. This comparison can

30 be important in those cases wherein it is desirable to identify compounds that disrupt interactions of mutant but not normal target gene products.

[00205] These assays can be conducted in a heterogeneous or homogeneous format. Heterogeneous assays involve anchoring either the target gene product or the binding partner onto a solid phase, and detecting complexes anchored on the solid phase at the end of the

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-49-

reaction. In homogeneous assays, the entire reaction is carried out in a liquid phase. In either approach, the order of addition of reactants can be varied to obtain different information about the compounds being tested. For example, test compounds that interfere with the interaction between the target gene products and the binding partners, e.g., by competition, can be identified by conducting the reaction in the presence of the test substance.

Alternatively, test compounds that disrupt preformed complexes, e.g., compounds with higher binding constants that displace one of the components from the complex, can be tested by adding the test compound to the reaction mixture after complexes have been formed. The various formats are briefly described below.

10 [00206] In a heterogeneous assay system, either the target gene product or the interactive cellular or extracellular binding partner, is anchored onto a solid surface (e.g., a microtiter plate), while the non-anchored species is labeled, either directly or indirectly. The anchored species can be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Alternatively, an immobilized antibody specific for the species to be anchored can be used to anchor the species to the solid surface.

15 [00207] In order to conduct the assay, the partner of the immobilized species is exposed to the coated surface with or without the test compound. After the reaction is complete, non-reacted components are removed (e.g., by washing) and any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. Where the non-immobilized species is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the non-immobilized species is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific for the initially non-immobilized species (the antibody, in turn, can be directly labeled or indirectly labeled with, e.g., a labeled anti-Ig antibody). Depending upon the order of addition of reaction components, test compounds that inhibit complex formation or that disrupt preformed complexes can be detected.

20 [00208] Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence or absence of the test compound, the reaction products separated from non-reacted components, and complexes detected; e.g., using an immobilized antibody specific for one of the binding components to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific for the other partner to detect anchored complexes. Again, depending upon the order of addition of reactants to the liquid phase, test compounds that inhibit complex or that disrupt preformed complexes can be identified.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-50-

[00209] In an alternate embodiment of the invention, a homogeneous assay can be used. For example, a preformed complex of the target gene product and the interactive cellular or extracellular binding partner product is prepared in that either the target gene products or their binding partners are labeled, but the signal generated by the label is quenched due to complex formation (e.g., U.S. Patent number 4,109,496 that utilizes this approach for immunoassays). The addition of a test substance that competes with and displaces one of the species from the preformed complex will result in the generation of a signal above background. In this way, test substances that disrupt target gene product-binding partner interaction can be identified.

[00210] In yet another aspect, the 93870 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (e.g., U.S. Patent number 5,283,317; Zervos *et al.*, (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; PCT publication number WO 94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with 93870 ("93870-binding proteins" or "93870-bp") and are involved in 93870 activity. Such 93870-bps can be activators or inhibitors of signals by the 93870 proteins or 93870 targets as, for example, downstream elements of a 93870-mediated signaling pathway.

[00211] The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for a 93870 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. (Alternatively, the 93870 protein can be fused to the activator domain). If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo* forming a 93870-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ) that is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the protein that interacts with the 93870 protein.

[00212] In another embodiment, modulators of 93870 expression are identified. For example, a cell or cell free mixture is contacted with a candidate compound and the expression of 93870 mRNA or protein evaluated relative to the level of expression of 93870

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-51-

mRNA or protein in the absence of the candidate compound. When expression of 93870 mRNA or protein is greater in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of 93870 mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of 93870 mRNA or protein is less (i.e., statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of 93870 mRNA or protein expression. The level of 93870 mRNA or protein expression can be determined by methods described herein for detecting 93870 mRNA or protein.

[00213] In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the assays described herein. For example, a modulating agent can be identified using a cell-based or a cell free assay, and the ability of the agent to modulate the activity of a 93870 protein can be confirmed *in vivo*, e.g., in an animal such as an animal model for a disease.

[00214] This invention further pertains to novel agents identified by the above-described screening assays. Accordingly, it is within the scope of this invention to further use an agent identified as described herein (e.g., a 93870 modulating agent, an antisense 93870 nucleic acid molecule, a 93870-specific antibody, or a 93870-binding partner) in an appropriate animal model to determine the efficacy, toxicity, side effects, or mechanism of action, of treatment with such an agent. Furthermore, novel agents identified by the above-described screening assays can be used for treatments as described herein.

Detection Assays

[00215] Portions or fragments of the nucleic acid sequences identified herein can be used as polynucleotide reagents. For example, these sequences can be used to: (i) map their respective genes on a chromosome, e.g., to locate gene regions associated with genetic disease or to associate 93870 with a disease; (ii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (iii) aid in forensic identification of a biological sample. These applications are described in the subsections below.

Chromosome Mapping

[00216] The 93870 nucleotide sequences or portions thereof can be used to map the location of the 93870 genes on a chromosome. This process is called chromosome mapping. Chromosome mapping is useful in correlating the 93870 sequences with genes associated with disease.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-52-

[00217] Briefly, 93870 genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 base pairs in length) from the 93870 nucleotide sequence (e.g., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3). These primers can then be used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the 93870 sequences will yield an amplified fragment.

[00218] A panel of somatic cell hybrids in which each cell line contains either a single human chromosome or a small number of human chromosomes, and a full set of mouse chromosomes, can allow easy mapping of individual genes to specific human chromosomes (D'Eustachio *et al.* (1983) *Science* 220:919-924).

[00219] Other mapping strategies e.g., *in situ* hybridization as described (Fan *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6223-6227), pre-screening with labeled flow-sorted chromosomes, and pre-selection by hybridization to chromosome specific cDNA libraries can be used to map 93870 to a chromosomal location.

[00220] Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of a DNA sequence to a metaphase chromosomal spread can further be used to provide a precise chromosomal location in one step. The FISH technique can be used with a DNA sequence as short as 500 or 600 bases. However, clones larger than 1,000 bases have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. Preferably 1,000 bases, and more preferably 2,000 bases will suffice to get good results at a reasonable amount of time. For a review of FISH, (see Verma *et al.* (1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York).

[00221] Reagents for chromosome mapping can be used individually to mark a single chromosome or a single site on that chromosome, or panels of reagents can be used for marking multiple sites and/or multiple chromosomes. Reagents corresponding to non-coding regions of the genes are typically preferred for mapping purposes. Coding sequences are more likely to be conserved within gene families, thus increasing the chance of cross hybridizations during chromosomal mapping.

[00222] Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data (such data are found, for example, in V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between a gene and a disease, mapped to the same chromosomal region, can then be identified through linkage analysis (co-inheritance of physically adjacent genes), as described (e.g., Egeland *et al.*, 1987, *Nature*, 325:783-787).

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-53-

[00223] Moreover, differences in the DNA sequences between individuals affected and unaffected with a disease associated with the 93870 gene, can be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any unaffected individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the particular disease. Comparison of affected and unaffected individuals generally involves first looking for structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations that are visible from chromosome spreads or detectable using PCR based on that DNA sequence. Ultimately, complete sequencing of genes from several individuals can be performed to confirm the presence of a mutation and to distinguish mutations from polymorphisms.

Tissue Typing

[00224] 93870 sequences can be used to identify individuals from biological samples using, e.g., restriction fragment length polymorphism (RFLP). In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, the fragments separated, e.g., in a Southern blot, and probed to yield bands for identification. The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP (described in U.S. Patent number 5,272,057).

[00225] Furthermore, the sequences of the present invention can also be used to determine the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the 93870 nucleotide sequence described herein can be used to prepare PCR primers homologous to the 5'- and 3'-ends of the sequence. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it. Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences.

[00226] Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the non-coding regions. Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in the non-coding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The non-coding sequences of SEQ ID NO:1 can provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers which each yield a non-coding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences are used, such as those in SEQ ID NO:3, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-54-

5 [00227] If a panel of reagents from 93870 nucleotide sequences described herein is used to generate a unique identification database for an individual, those same reagents can later be used to identify tissue from that individual. Using the unique identification database, positive identification of the individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

Use of Partial 93870 Sequences in Forensic Biology

10 [00228] DNA-based identification techniques can also be used in forensic biology. To make such an identification, PCR technology can be used to amplify DNA sequences taken from very small biological samples such as tissues, e.g., hair or skin, or body fluids, e.g., blood, saliva, or semen found at a crime scene. The amplified sequence can then be compared to a standard, thereby allowing identification of the origin of the biological sample.

15 [00229] The sequences of the present invention can be used to provide polynucleotide reagents, e.g., PCR primers, targeted to specific loci in the human genome, which can enhance the reliability of DNA-based forensic identifications by, for example, providing another "identification marker" (i.e., another DNA sequence that is unique to a particular individual). As mentioned above, actual nucleotide sequence information can be used for identification as an accurate alternative to patterns formed by restriction enzyme generated fragments. Sequences targeted to non-coding regions of SEQ ID NO:1 (e.g., fragments
20 having a length of at least 20 nucleotide residues, preferably at least 30 nucleotide residues) are particularly appropriate for this use.

[00230] The 93870 nucleotide sequences described herein can further be used to provide polynucleotide reagents, e.g., labeled or label-able probes which can be used in, for example, an *in situ* hybridization technique, to identify a specific tissue, e.g., a tissue containing
25 hematopoietic cells. This can be very useful in cases where a forensic pathologist is presented with a tissue of unknown origin. Panels of such 93870 probes can be used to identify tissue by species and/or by organ type.

[00231] In a similar fashion, these reagents, e.g., 93870 primers or probes can be used to screen tissue culture for contamination (i.e., to screen for the presence of a mixture of
30 different types of cells in a culture).

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-55-

Predictive Medicine

[00232] The present invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual.

5 **[00233]** Generally, the invention provides a method of determining if a subject is at risk for a disorder related to a lesion in, or the mis-expression of, a gene that encodes a 93870 polypeptide.

[00234] Such disorders include, e.g., a disorder associated with the mis-expression of a 93870 polypeptide, e.g., an immune disorder or a neoplastic disorder.

10 **[00235]** The method includes one or more of the following:

[00236] detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation which affects the expression of the 93870 gene, or detecting the presence or absence of a mutation in a region which controls the expression of the gene, e.g., a mutation in the 5'-control region;

15 **[00237]** detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation which alters the structure of the 93870 gene;

[00238] detecting, in a tissue of the subject, the mis-expression of the 93870 gene at the mRNA level, e.g., detecting a non-wild-type level of a mRNA; and

[00239] detecting, in a tissue of the subject, the mis-expression of the gene at the protein level, e.g., detecting a non-wild-type level of a 93870 polypeptide.

20 **[00240]** In preferred embodiments the method includes: ascertaining the existence of at least one of: a deletion of one or more nucleotides from the 93870 gene; an insertion of one or more nucleotides into the gene, a point mutation, e.g., a substitution of one or more nucleotides of the gene, a gross chromosomal rearrangement of the gene, e.g., a translocation, inversion, or deletion.

25 **[00241]** For example, detecting the genetic lesion can include: (i) providing a probe/primer including an oligonucleotide containing a region of nucleotide sequence which hybridizes to a sense or antisense sequence from SEQ ID NO:1, or naturally occurring mutants thereof, or 5'- or 3'-flanking sequences naturally associated with the 93870 gene; (ii) exposing the probe/primer to nucleic acid of the tissue; and detecting the presence or absence of the
30 genetic lesion by hybridization of the probe/primer to the nucleic acid, e.g., by *in situ* hybridization.

[00242] In preferred embodiments, detecting the mis-expression includes ascertaining the existence of at least one of: an alteration in the level of a messenger RNA transcript of the

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-56-

93870 gene; the presence of a non-wild-type splicing pattern of a messenger RNA transcript of the gene; or a non-wild-type level of 93870 RNA or protein.

[00243] Methods of the invention can be used for prenatal screening or to determine if a subject's offspring will be at risk for a disorder.

5 [00244] In preferred embodiments the method includes determining the structure of a 93870 gene, an abnormal structure being indicative of risk for the disorder.

[00245] In preferred embodiments the method includes contacting a sample from the subject with an antibody to the 93870 protein or a nucleic acid, which hybridizes specifically with the gene. These and other embodiments are discussed below.

10

Diagnostic and Prognostic Assays

[00246] The presence, level, or absence of 93870 protein or nucleic acid in a biological sample can be evaluated by obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting 93870 protein or
15 nucleic acid (e.g., mRNA, genomic DNA) that encodes 93870 protein such that the presence of 93870 protein or nucleic acid is detected in the biological sample. The term "biological sample" includes tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. A preferred biological sample is serum. The level of expression of the 93870 gene can be measured in a number of ways, including, but not
20 limited to: measuring the mRNA encoded by the 93870 genes; measuring the amount of protein encoded by the 93870 genes; or measuring the activity of the protein encoded by the 93870 genes.

[00247] The level of mRNA corresponding to the 93870 gene in a cell can be determined both by *in situ* and by *in vitro* formats.

25 [00248] The isolated mRNA can be used in hybridization or amplification assays that include, but are not limited to, Southern or Northern analyses, polymerase chain reaction analyses and probe arrays. One preferred diagnostic method for the detection of mRNA levels involves contacting the isolated mRNA with a nucleic acid molecule (probe) that can hybridize to the mRNA encoded by the gene being detected. The nucleic acid probe can be,
30 for example, a full-length 93870 nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1, the deposited nucleotide sequence, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 7, 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to 93870 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays are described herein.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-57-

[00249] In one format, mRNA (or cDNA) is immobilized on a surface and contacted with the probes, for example by running the isolated mRNA on an agarose gel and transferring the mRNA from the gel to a membrane, such as nitrocellulose. In an alternative format, the probes are immobilized on a surface and the mRNA (or cDNA) is contacted with the probes, for example, in a two-dimensional gene chip array. A skilled artisan can adapt known mRNA detection methods for use in detecting the level of mRNA encoded by the 93870 genes.

5 [00250] The level of mRNA in a sample that is encoded by 93870 can be evaluated with nucleic acid amplification, e.g., by RT-PCR (U.S. Patent number 4,683,202), ligase chain reaction (Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), self-sustained sequence replication (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), rolling circle replication (U.S. Patent number 5,854,033) or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques known in the art. As used herein, amplification primers are defined as being a pair of nucleic acid molecules that can anneal to 15 5'- or 3'-regions of a 93870 gene (plus and minus strands, respectively, or vice-versa) and contain a short region in between. In general, amplification primers are from about 10 to 30 nucleotides in length and flank a region from about 50 to 200 nucleotides in length. Under appropriate conditions and with appropriate reagents, such primers permit the amplification of a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence between the primers.

20 [00251] For *in situ* methods, a cell or tissue sample can be prepared/processed and immobilized on a support, typically a glass slide, and then contacted with a probe that can hybridize to mRNA that encodes the 93870 gene being analyzed.

[00252] In another embodiment, the methods include further contacting a control sample with a compound or agent capable of detecting 93870 mRNA, or genomic DNA, and comparing the presence of 93870 mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 93870 mRNA or genomic DNA in the test sample.

25 [00253] A variety of methods can be used to determine the level of protein encoded by 93870. In general, these methods include contacting an agent that selectively binds to the protein, such as an antibody with a sample, to evaluate the level of protein in the sample. In a preferred embodiment, the antibody bears a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or F(ab')₂) can be used. The term "labeled," with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-58-

detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with a detectable substance. Examples of detectable substances are provided herein.

5 [00254] The detection methods can be used to detect 93870 protein in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. *In vitro* techniques for detection of 93870 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), immunoprecipitations, immunofluorescence, enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), and Western blot analysis. *In vivo* techniques for detection of 93870 protein include introducing into a subject a labeled anti-93870 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose
10 presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

[00255] In another embodiment, the methods further include contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting 93870 protein, and comparing the presence of 93870 protein in the control sample with the presence of 93870 protein in the test sample.

15 [00256] The invention also includes kits for detecting the presence of 93870 in a biological sample. For example, the kit can include a compound or agent capable of detecting 93870 protein or mRNA in a biological sample, and a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect 93870 protein or nucleic acid.

20 [00257] For antibody-based kits, the kit can include: (1) a first antibody (e.g., attached to a solid support) which binds to a polypeptide corresponding to a marker of the invention; and, optionally, (2) a second, different antibody which binds to either the polypeptide or the first antibody and is conjugated to a detectable agent.

25 [00258] For oligonucleotide-based kits, the kit can include: (1) an oligonucleotide, e.g., a detectably-labeled oligonucleotide, which hybridizes to a nucleic acid sequence encoding a polypeptide corresponding to a marker of the invention or (2) a pair of primers useful for amplifying a nucleic acid molecule corresponding to a marker of the invention. The kit can also include a buffering agent, a preservative, or a protein-stabilizing agent. The kit can also include components necessary for detecting the detectable agent (e.g., an enzyme or a substrate). The kit can also contain a control sample or a series of control samples that can be
30 assayed and compared to the test sample contained. Each component of the kit can be enclosed within an individual container and all of the various containers can be within a single package, along with instructions for interpreting the results of the assays performed using the kit.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-59-

[00259] The diagnostic methods described herein can identify subjects having, or at risk of developing, a disease or disorder associated with misexpressed, aberrant or unwanted 93870 expression or activity. As used herein, the term "unwanted" includes an unwanted phenomenon involved in a biological response such as pain or deregulated cell proliferation.

5 [00260] In one embodiment, a disease or disorder associated with aberrant or unwanted 93870 expression or activity is identified. A test sample is obtained from a subject and 93870 protein or nucleic acid (e.g., mRNA or genomic DNA) is evaluated, wherein the level, e.g., the presence or absence, of 93870 protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or
10 expression or activity. As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest, including a biological fluid (e.g., serum), cell sample, or tissue.

[00261] The prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated
15 with aberrant or unwanted 93870 expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent that modulates 93870 expression or activity.

[00262] The methods of the invention can also be used to detect genetic alterations in a 93870 gene, thereby determining if a subject with the altered gene is at risk for a disorder
20 characterized by misregulation in 93870 protein activity or nucleic acid expression, such as a disorder associated with chemokine interactions, inflammation, neurotransmission, light reception, or hormone reception. In preferred embodiments, the methods include detecting, in a sample from the subject, the presence or absence of a genetic alteration characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a 93870 protein, or the
25 mis-expression of the 93870 gene. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a 93870 gene; 2) an addition of one or more nucleotides to a 93870 gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of a 93870 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 93870 gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 93870 gene, 6) aberrant
30 modification of a 93870 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild-type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a 93870 gene, 8) a non-wild-type level of a 93870 protein, 9) allelic loss of a 93870 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 93870 protein.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-60-

[00263] An alteration can be detected without a probe/primer in a polymerase chain reaction, such as anchor PCR or RACE-PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the 93870 gene. This method can include the steps of collecting a sample of cells from a subject, isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a 93870 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 93870 gene occurs (if present), and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR can be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

[00264] Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), or other nucleic acid amplification methods, followed by the detection of the amplified molecules using techniques known to those of skill in the art.

[00265] In another embodiment, mutations in a 93870 gene from a sample cell can be identified by detecting alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined, e.g., by gel electrophoresis, and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (e.g., U.S. Patent number 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

[00266] In other embodiments, genetic mutations in 93870 can be identified by hybridizing a sample to control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, by, e.g., two-dimensional arrays, or, e.g., chip based arrays. Such arrays include a plurality of addresses, each of which is positionally distinguishable from the other. A different probe is located at each address of the plurality. The arrays can have a high density of addresses, e.g., can contain hundreds or thousands of oligonucleotides probes (Cronin *et al.* (1996) *Hum. Mutat.* 7:244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Med.* 2:753-759). For example, genetic mutations in 93870 can be identified in two-dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described (Cronin *et al. supra*). Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-61-

long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

[00267] In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the 93870 gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample 93870 with the corresponding wild-type (control) sequence.

Automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (1995, *Biotechniques* 19:448), including sequencing by mass spectrometry.

[00268] Other methods for detecting mutations in the 93870 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242; Cotton *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295).

[00269] In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in 93870 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662; U.S. Patent number 5,459,039).

[00270] In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 93870 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) can be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild-type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control 93870 nucleic acids will be denatured and allowed to re-nature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments can be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay can be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-62-

preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

5 **[00271]** In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 base pairs of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a
10 denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

[00272] Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163; Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
15 86:6230).

[00273] Alternatively, allele specific amplification technology that depends on selective PCR amplification can be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification can carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization; Gibbs *et al.* (1989)
20 *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3'-end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner, 1993, *Tibtech* 11:238). In addition, it can be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments, amplification can also be
25 performed using Taq ligase for amplification (Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3'-end of the 5'- sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

[00274] The methods described herein can be performed, for example, using pre-packaged
30 diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which can be conveniently used, e.g., in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a 93870 gene.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-63-

Use of 93870 Molecules as Surrogate Markers

[00275] The 93870 molecules of the invention are also useful as markers of disorders or disease states, as markers for precursors of disease states, as markers for predisposition of disease states, as markers of drug activity, or as markers of the pharmacogenomic profile of a subject. Using the methods described herein, the presence, absence and/or quantity of the 93870 molecules of the invention can be detected, and can be correlated with one or more biological states *in vivo*. For example, the 93870 molecules of the invention can serve as surrogate markers for one or more disorders or disease states or for conditions leading up to disease states. As used herein, a "surrogate marker" is an objective biochemical marker which correlates with the absence or presence of a disease or disorder, or with the progression of a disease or disorder (e.g., with the presence or absence of a tumor). The presence or quantity of such markers is independent of the disease. Therefore, these markers can serve to indicate whether a particular course of treatment is effective in lessening a disease state or disorder. Surrogate markers are of particular use when the presence or extent of a disease state or disorder is difficult to assess through standard methodologies (e.g., early stage tumors), or when an assessment of disease progression is desired before a potentially dangerous clinical endpoint is reached (e.g., an assessment of cardiovascular disease can be made using cholesterol levels as a surrogate marker, and an analysis of HIV infection can be made using HIV RNA levels as a surrogate marker, well in advance of the undesirable clinical outcomes of myocardial infarction or fully-developed AIDS). Examples of the use of surrogate markers have been described (e.g., Koomen *et al.* (2000) *J. Mass. Spectrom.* 35:258-264; James (1994) *AIDS Treat. News Arch.* 209).

[00276] The 93870 molecules of the invention are also useful as pharmacodynamic markers. As used herein, a "pharmacodynamic marker" is an objective biochemical marker which correlates specifically with drug effects. The presence or quantity of a pharmacodynamic marker is not related to the disease state or disorder for which the drug is being administered; therefore, the presence or quantity of the marker is indicative of the presence or activity of the drug in a subject. For example, a pharmacodynamic marker can be indicative of the concentration of the drug in a biological tissue, in that the marker is either expressed or transcribed or not expressed or transcribed in that tissue in relationship to the level of the drug. In this fashion, the distribution or uptake of the drug can be monitored by the pharmacodynamic marker. Similarly, the presence or quantity of the pharmacodynamic marker can be related to the presence or quantity of the metabolic product of a drug, such that the presence or quantity of the marker is indicative of the relative breakdown rate of the drug

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-64-

in vivo. Pharmacodynamic markers are of particular use in increasing the sensitivity of detection of drug effects, particularly when the drug is administered in low doses. Since even a small amount of a drug can be sufficient to activate multiple rounds of marker (e.g., a 93870 marker) transcription or expression, the amplified marker can be in a quantity which is more readily detectable than the drug itself. Also, the marker can be more easily detected due to the nature of the marker itself; for example, using the methods described herein, anti-93870 antibodies can be employed in an immune-based detection system for a 93870 protein marker, or 93870-specific radiolabeled probes can be used to detect a 93870 mRNA marker. Furthermore, the use of a pharmacodynamic marker can offer mechanism-based prediction of risk due to drug treatment beyond the range of possible direct observations. Examples of the use of pharmacodynamic markers have been described (e.g., U.S. Patent number 6,033,862; Hattis *et al.* (1991) *Env. Health Perspect.* 90: 229-238; Schentag (1999) *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S21-S24; Nicolau (1999) *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S16-S20).

[00277] The 93870 molecules of the invention are also useful as pharmacogenomic markers. As used herein, a "pharmacogenomic marker" is an objective biochemical marker which correlates with a specific clinical drug response or susceptibility in a subject (e.g., McLeod *et al.* (1999) *Eur. J. Cancer* 35:1650-1652). The presence or quantity of the pharmacogenomic marker is related to the predicted response of the subject to a specific drug or class of drugs prior to administration of the drug. By assessing the presence or quantity of one or more pharmacogenomic markers in a subject, a drug therapy which is most appropriate for the subject, or which is predicted to have a greater degree of success, can be selected. For example, based on the presence or quantity of RNA, or protein (e.g., 93870 protein or RNA) for specific tumor markers in a subject, a drug or course of treatment can be selected that is optimized for the treatment of the specific tumor likely to be present in the subject. Similarly, the presence or absence of a specific sequence mutation in 93870 DNA can correlate 93870 drug response. The use of pharmacogenomic markers therefore permits the application of the most appropriate treatment for each subject without having to administer the therapy.

30

Pharmaceutical Compositions

[00278] The nucleic acid and polypeptides, fragments thereof, as well as anti-93870 antibodies and small molecule modulators of 93870 (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions. Such

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-65-

compositions typically include the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" includes solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

[00279] A pharmaceutical composition is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

[00280] Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It should be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents,

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-66-

for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including an agent in the composition that delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

5 [00281] Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the
10 case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying, which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

[00282] Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. For the
15 purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules, e.g., gelatin capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash. Pharmaceutically compatible binding agents and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of
20 the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder, such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient, such as starch or lactose; a disintegrating agent, such as alginic acid, Primogel™, or corn starch; a lubricant, such as magnesium stearate or Sterotes™; a glidant, such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent, such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent, such as peppermint, methyl
25 salicylate, or orange flavoring.

[00283] For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser that contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

[00284] Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For
30 transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-67-

sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

[00285] The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

[00286] In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells using monoclonal antibodies directed towards viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers.

These can be prepared according to described methods (e.g., U.S. Patent number 4,522,811).

[00287] It is advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

[00288] Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds that exhibit high therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects can be used, care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

[00289] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-68-

invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC_{50} (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

5
10
15
20
[00290] As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (i.e., an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 milligrams per kilogram body weight, preferably about 0.01 to 25 milligrams per kilogram body weight, more preferably about 0.1 to 20 milligrams per kilogram body weight, and even more preferably about 1 to 10 milligrams per kilogram, 2 to 9 milligrams per kilogram, 3 to 8 milligrams per kilogram, 4 to 7 milligrams per kilogram, or 5 to 6 milligrams per kilogram body weight. The protein or polypeptide can be administered one time per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. The skilled artisan will appreciate that certain factors can influence the dosage and timing required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.

25
[00291] For antibodies, the preferred dosage is 0.1 milligrams per kilogram of body weight (generally 10 to 20 milligrams per kilogram). If the antibody is to act in the brain, a dosage of 50 to 100 milligrams per kilogram is usually appropriate. Generally, partially human antibodies and fully human antibodies have a longer half-life within the human body than other antibodies. Accordingly, lower dosages and less frequent administration is often possible. Modifications such as lipidation can be used to stabilize antibodies and to enhance uptake and tissue penetration (e.g., into the brain). A method for the lipidation of antibodies is described by Cruikshank *et al.* (1997) *J. AIDS Hum. Retrovir.* 14:193.

30
[00292] The present invention encompasses agents that modulate expression or activity. An agent may, for example, be a small molecule. For example, such small molecules include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics (e.g., peptoids), amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (i.e., including hetero-organic and organo-metallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-69-

having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds.

- 5 [00293] Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per kilogram of subject or sample weight (e.g., about 1 microgram per kilogram to about 500 milligrams per kilogram, about 100 micrograms per kilogram to about 5 milligrams per kilogram, or about 1 microgram per kilogram to about 50 micrograms per kilogram. It is furthermore understood that appropriate doses of a small molecule depend upon the potency
- 10 of the small molecule with respect to the expression or activity to be modulated. When one or more of these small molecules is to be administered to an animal (e.g., a human) in order to modulate expression or activity of a polypeptide or nucleic acid of the invention, a physician, veterinarian, or researcher may, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is
- 15 understood that the specific dose level for any particular animal subject will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health, gender, and diet of the subject, the time of administration, the route of administration, the rate of excretion, any drug combination, and the degree of expression or activity to be modulated.
- 20 [00294] An antibody (or fragment thereof) can be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone,
- 25 mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine
- 30 (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-70-

[00295] The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, and the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety can be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins can include, for example, a toxin such as abrin, ricin
5 A, gelonin, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, alpha-interferon, beta-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukins-1, -2, and -6, granulocyte macrophage colony stimulating factor, granulocyte colony stimulating factor, or other growth factors.

10 [00296] Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent number 4,676,980.

[00297] The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent number 5,328,470) or by
15 stereotactic injection (e.g., Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can
20 include one or more cells which produce the gene delivery system.

[00298] The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Methods of Treatment

25 [00299] The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant or unwanted 93870 expression or activity. With regards to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments can be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics," as
30 used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (e.g., a patient's "drug response phenotype," or "drug response genotype".) Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-71-

individual's prophylactic or therapeutic treatment with either the 93870 molecules of the present invention or 93870 modulators according to that individual's drug response genotype.

[00300] Treatment is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of disease or a predisposition toward a disease, with the purpose to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease, the symptoms of disease or the predisposition toward disease.

[00301] A therapeutic agent includes, but is not limited to, small molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.

[00302] Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

[00303] In one aspect, the invention provides a method for preventing a disease or condition in a subject associated with an aberrant or unwanted 93870 expression or activity, by administering to the subject a 93870 or an agent which modulates 93870 expression, or at least one 93870 activity. Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to by aberrant or unwanted 93870 expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of the 93870 aberrance, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 93870 aberrance, for example, a 93870 agonist or 93870 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

[00304] It is possible that some 93870 disorders can be caused, at least in part, by an abnormal level of gene product, or by the presence of a gene product exhibiting abnormal activity. As such, the reduction in the level and/or activity of such gene products would bring about the amelioration of disorder symptoms.

[00305] As discussed, successful treatment of 93870 disorders can be brought about by techniques that serve to inhibit the expression or activity of target gene products. For example, compounds, e.g., an agent identified using an assays described above, that proves to exhibit negative modulatory activity, can be used in accordance with the invention to prevent and/or ameliorate symptoms of 93870 disorders. Such molecules can include, but are not limited to peptides, phosphopeptides, small organic or inorganic molecules, or antibodies (including, for example, polyclonal, monoclonal, human, humanized, anti-idiotypic, chimeric

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-72-

or single chain antibodies, and Fab, F(ab)₂ and Fab expression library fragments, scFV molecules, and epitope-binding fragments thereof).

[00306] Further, antisense and ribozyme molecules that inhibit expression of the target gene can also be used in accordance with the invention to reduce the level of target gene expression, thus effectively reducing the level of target gene activity. Still further, triple helix molecules can be utilized in reducing the level of target gene activity. Antisense, ribozyme and triple helix molecules are discussed above.

[00307] It is possible that the use of antisense, ribozyme, and/or triple helix molecules to reduce or inhibit mutant gene expression can also reduce or inhibit the transcription (triple helix) and/or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal target gene alleles, such that the concentration of normal target gene product present can be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, nucleic acid molecules that encode and express target gene polypeptides exhibiting normal target gene activity can be introduced into cells via gene therapy method. Alternatively, in instances in that the target gene encodes an extracellular protein, it can be preferable to co-administer normal target gene protein into the cell or tissue in order to maintain the requisite level of cellular or tissue target gene activity.

[00308] Another method by which nucleic acid molecules can be utilized in treating or preventing a disease characterized by 93870 expression is through the use of aptamer molecules specific for 93870 protein. Aptamers are nucleic acid molecules having a tertiary structure that permits them to specifically bind to protein ligands (e.g., Osborne *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:5-9; Patel (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:32-46). Since nucleic acid molecules can in many cases be more conveniently introduced into target cells than therapeutic protein molecules can be, aptamers offer a method by which 93870 protein activity can be specifically decreased without the introduction of drugs or other molecules which can have pluripotent effects.

[00309] Antibodies can be generated that are both specific for target gene product and that reduce target gene product activity. Such antibodies may, therefore, be administered in instances whereby negative modulatory techniques are appropriate for the treatment of 93870 disorders.

[00310] In circumstances wherein injection of an animal or a human subject with a 93870 protein or epitope for stimulating antibody production is harmful to the subject, it is possible to generate an immune response against 93870 through the use of anti-idiotypic antibodies (e.g., Herlyn (1999) *Ann. Med.* 31:66-78; Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1998) *Cancer Treat. Res.* 94:51-68. If an anti-idiotypic antibody is introduced into a mammal or human subject, it

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-73-

should stimulate the production of anti-anti-idiotypic antibodies, which should be specific to the 93870 protein. Vaccines directed to a disease characterized by 93870 expression can also be generated in this fashion.

[00311] In instances where the target antigen is intracellular and whole antibodies are used, internalizing antibodies can be preferred. Lipofectin or liposomes can be used to deliver the antibody or a fragment of the Fab region that binds to the target antigen into cells. Where fragments of the antibody are used, the smallest inhibitory fragment that binds to the target antigen is preferred. For example, peptides having an amino acid sequence corresponding to the Fv region of the antibody can be used. Alternatively, single chain neutralizing antibodies that bind to intracellular target antigens can also be administered. Such single chain antibodies can be administered, for example, by expressing nucleotide sequences encoding single-chain antibodies within the target cell population (e.g., Marasco *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893).

[00312] The identified compounds that inhibit target gene expression, synthesis and/or activity can be administered to a patient at therapeutically effective doses to prevent, treat or ameliorate GPCR disorders. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms of the disorders.

[00313] Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Compounds that exhibit large therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects can be used, care should be taken to design a delivery system that targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

[00314] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (i.e., the concentration of the test compound that

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-74-

achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

5 [00315] Another example of determination of effective dose for an individual is the ability to directly assay levels of "free" and "bound" compound in the serum of the test subject. Such assays can utilize antibody mimics and/or "biosensors" that have been created through molecular imprinting techniques. The compound which is able to modulate 93870 activity is used as a template, or "imprinting molecule," to spatially organize polymerizable monomers prior to their polymerization with catalytic reagents. The subsequent removal of the imprinted molecule leaves a polymer matrix that contains a repeated "negative image" of the compound and is able to selectively rebind the molecule under biological assay conditions. Detailed reviews of this technique appear in the art (Ansell *et al.* (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:89-94; Shea (1994) *Trends Polymer Sci.* 2:166-173). Such "imprinted" affinity matrixes are amenable to ligand-binding assays, whereby the immobilized monoclonal antibody component is replaced by an appropriately imprinted matrix (e.g., a matrix described in Vlatakis *et al.* (1993) *Nature* 361:645-647. Through the use of isotope-labeling, the "free" concentration of compound which modulates the expression or activity of 93870 can be readily monitored and used in calculations of IC_{50} .

20 [00316] Such "imprinted" affinity matrixes can also be designed to include fluorescent groups whose photon-emitting properties measurably change upon local and selective binding of target compound. These changes can be readily assayed in real time using appropriate fiber optic devices, in turn allowing the dose in a test subject to be quickly optimized based on its individual IC_{50} . A rudimentary example of such a "biosensor" is discussed in Kriz *et al.* (1995) *Anal. Chem.* 67:2142-2144.

25 [00317] Another aspect of the invention pertains to methods of modulating 93870 expression or activity for therapeutic purposes. Accordingly, in an exemplary embodiment, the modulatory method of the invention involves contacting a cell with a 93870 or agent that modulates one or more of the activities of 93870 protein activity associated with the cell. An agent that modulates 93870 protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring target molecule of a 93870 protein (e.g., a 30 93870 substrate or receptor), a 93870 antibody, a 93870 agonist or antagonist, a peptidomimetic of a 93870 agonist or antagonist, or other small molecule.

[00318] In one embodiment, the agent stimulates one or 93870 activities. Examples of such stimulatory agents include active 93870 protein and a nucleic acid molecule encoding

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-75-

93870. In another embodiment, the agent inhibits one or more 93870 activities. Examples of such inhibitory agents include antisense 93870 nucleic acid molecules, anti-93870 antibodies, and 93870 inhibitors. These modulatory methods can be performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject).

5 As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant or unwanted expression or activity of a 93870 protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., up-regulates or down-regulates) 93870 expression or activity. In
10 another embodiment, the method involves administering a 93870 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 93870 expression or activity.

[00319] Stimulation of 93870 activity is desirable in situations in which 93870 is abnormally down-regulated and/or in which increased 93870 activity is likely to have a
15 beneficial effect. For example, stimulation of 93870 activity is desirable in situations in which a 93870 is down-regulated and/or in which increased 93870 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of 93870 activity is desirable in situations in which 93870 is abnormally up-regulated and/or in which decreased 93870 activity is likely to have a beneficial effect.

20 **[00320]** The 93870 molecules can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more of immune and inflammatory disorders, platelet disorders, skeletal or bone metabolism disorders, and bone marrow mononuclear cell disorders described above, as well as cellular proliferative and/or differentiative disorders, hormonal disorders, neurological disorders, cardiovascular disorders, blood vessel disorders, viral
25 diseases, liver disorders, and pain and metabolic disorders described below.

[00321] Examples of cellular proliferative and/or differentiative disorders include cancer, e.g., carcinoma, sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic neoplastic disorders, e.g., leukemias. A metastatic tumor can arise from a multitude of primary tumor types, including but not limited to those of prostate, colon, lung, breast and liver origin.

30 **[00322]** As used herein, the term "cancer" (also used interchangeably with the terms, "hyperproliferative" and "neoplastic") refers to cells having the capacity for autonomous growth, i.e., an abnormal state or condition characterized by rapidly proliferating cell growth. Cancerous disease states may be categorized as pathologic, i.e., characterizing or constituting a disease state, e.g., malignant tumor growth, or may be categorized as non-pathologic, i.e., a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-76-

deviation from normal but not associated with a disease state, e.g., cell proliferation associated with wound repair. The term is meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues, or organs, irrespective of histopathologic type or stage of invasiveness. The term "cancer" includes malignancies of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, thyroid, lymphoid, gastrointestinal, and genito-urinary tract, as well as adenocarcinomas which include malignancies such as most colon cancers, renal-cell carcinoma, prostate cancer and/or testicular tumors, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus. The term "carcinoma" is art recognized and refers to malignancies of epithelial or endocrine tissues including respiratory system carcinomas, gastrointestinal system carcinomas, genitourinary system carcinomas, testicular carcinomas, breast carcinomas, prostatic carcinomas, endocrine system carcinomas, and melanomas. Exemplary carcinomas include those forming from tissue of the cervix, lung, prostate, breast, head and neck, colon and ovary. The term "carcinoma" also includes carcinosarcomas, e.g., which include malignant tumors composed of carcinomatous and sarcomatous tissues. An "adenocarcinoma" refers to a carcinoma derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures. The term "sarcoma" is art recognized and refers to malignant tumors of mesenchymal derivation.

[00323] The 93870 molecules of the invention can be used to monitor, treat and/or diagnose a variety of proliferative disorders. Such disorders include hematopoietic neoplastic disorders. As used herein, the term "hematopoietic neoplastic disorders" includes diseases involving hyperplastic/neoplastic cells of hematopoietic origin, e.g., arising from myeloid, lymphoid or erythroid lineages, or precursor cells thereof. Typically, the diseases arise from poorly differentiated acute leukemias, e.g., erythroblastic leukemia and acute megakaryoblastic leukemia. Additional exemplary myeloid disorders include, but are not limited to, acute promyeloid leukemia (APML), acute myelogenous leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML) (reviewed in Vaickus, L., (1991) *Crit. Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); lymphoid malignancies include, but are not limited to acute lymphoblastic leukemia (ALL) which includes B-lineage ALL and T-lineage ALL, chronic lymphocytic leukemia (CLL), prolymphocytic leukemia (PLL), hairy cell leukemia (HLL) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM). Additional forms of malignant lymphomas include, but are not limited to non-Hodgkin lymphoma and variants thereof, peripheral T cell lymphomas, adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), large granular lymphocytic leukemia (LGF), Hodgkin's disease and Reed-Sternberg disease.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-77-

- [00324] GPCR-associated disorders can include hormonal disorders, such as conditions or diseases in which the production and/or regulation of hormones in an organism is aberrant. Examples of such disorders and diseases include type I and type II diabetes mellitus, pituitary disorders (*e.g.*, growth disorders), thyroid disorders (*e.g.*, hypothyroidism or hyperthyroidism), and reproductive or fertility disorders (*e.g.*, disorders which affect the organs of the reproductive system, *e.g.*, the prostate gland, the uterus, or the vagina; disorders which involve an imbalance in the levels of a reproductive hormone in a subject; disorders affecting the ability of a subject to reproduce; and disorders affecting secondary sex characteristic development, *e.g.*, adrenal hyperplasia).
- 10 [00325] Additional GPCR-associated disorders are neurological disorders. Such neurological disorders include, for example, disorders involving neurons, and disorders involving glia, such as astrocytes, oligodendrocytes, ependymal cells, and microglia; cerebral edema, raised intracranial pressure and herniation, and hydrocephalus; malformations and developmental diseases, such as neural tube defects, forebrain anomalies, posterior fossa anomalies, and syringomyelia and hydromyelia; perinatal brain injury; cerebrovascular diseases, such as those related to hypoxia, ischemia, and infarction, including hypotension, hypoperfusion, and low-flow states--global cerebral ischemia and focal cerebral ischemia--infarction from obstruction of local blood supply, intracranial hemorrhage, including intracerebral (intraparenchymal) hemorrhage, subarachnoid hemorrhage and ruptured berry aneurysms, and vascular malformations, hypertensive cerebrovascular disease, including lacunar infarcts, slit hemorrhages, and hypertensive encephalopathy; infections, such as acute meningitis, including acute pyogenic (bacterial) meningitis and acute aseptic (viral) meningitis, acute focal suppurative infections, including brain abscess, subdural empyema, and extradural abscess, chronic bacterial meningoenkephalitis, including tuberculosis and mycobacterioses, neurosyphilis, and neuroborreliosis (Lyme disease), viral meningoenkephalitis, including arthropod-borne (Arbo) viral encephalitis, *Herpes simplex* virus Type 1, *Herpes simplex* virus Type 2, *Varicella-zoster* virus (*Herpes zoster*), cytomegalovirus, poliomyelitis, rabies, and human immunodeficiency virus 1, including HIV-1 meningoenkephalitis (subacute encephalitis), vacuolar myelopathy, AIDS-associated myopathy, peripheral neuropathy, and AIDS in children, progressive multifocal leukoencephalopathy, subacute sclerosing panencephalitis, fungal meningoenkephalitis, other infectious diseases of the nervous system; transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases); demyelinating diseases, including multiple sclerosis, multiple sclerosis variants, acute disseminated encephalomyelitis and acute necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis,
- 15
20
25
30

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-78-

and other diseases with demyelination; degenerative diseases, such as degenerative diseases affecting the cerebral cortex, including Alzheimer's disease and Pick's disease, degenerative diseases of basal ganglia and brain stem, including Parkinsonism, idiopathic Parkinson's disease (paralysis agitans), progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, multiple system atrophy, including striatonigral degeneration, Shy-Drager syndrome, and olivopontocerebellar atrophy, and Huntington's disease; spinocerebellar degenerations, including spinocerebellar ataxias, including Friedreich ataxia, and ataxia-telangiectasia, degenerative diseases affecting motor neurons, including amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease), bulbospinal atrophy (Kennedy syndrome), and spinal muscular atrophy; inborn errors of metabolism, such as leukodystrophies, including Krabbe disease, metachromatic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, Pelizaeus-Merzbacher disease, and Canavan disease, mitochondrial encephalomyopathies, including Leigh disease and other mitochondrial encephalomyopathies; toxic and acquired metabolic diseases, including vitamin deficiencies such as thiamine (vitamin B₁) deficiency and vitamin B₁₂ deficiency, neurologic sequelae of metabolic disturbances, including hypoglycemia, hyperglycemia, and hepatic encephalopathy, toxic disorders, including carbon monoxide, methanol, ethanol, and radiation, including combined methotrexate and radiation-induced injury; tumors, such as gliomas, including astrocytoma, including fibrillary (diffuse) astrocytoma and glioblastoma multiforme, pilocytic astrocytoma, pleomorphic xanthoastrocytoma, and brain stem glioma, oligodendroglioma, and ependymoma and related paraventricular mass lesions, neuronal tumors, poorly differentiated neoplasms, including medulloblastoma, other parenchymal tumors, including primary brain lymphoma, germ cell tumors, and pineal parenchymal tumors, meningiomas, metastatic tumors, paraneoplastic syndromes, peripheral nerve sheath tumors, including schwannoma, neurofibroma, and malignant peripheral nerve sheath tumor (malignant schwannoma), and neurocutaneous syndromes (phakomatoses), including neurofibromatosis, including Type 1 neurofibromatosis (NF1) and TYPE 2 neurofibromatosis (NF2), tuberous sclerosis, and Von Hippel-Lindau disease.

[00326] Cardiovascular disorders include, but are not limited to, heart failure, including but not limited to, cardiac hypertrophy, left-sided heart failure, and right-sided heart failure; ischemic heart disease, including but not limited to angina pectoris, myocardial infarction, chronic ischemic heart disease, and sudden cardiac death; hypertensive heart disease, including but not limited to, systemic (left-sided) hypertensive heart disease and pulmonary (right-sided) hypertensive heart disease; valvular heart disease, including but not limited to, valvular degeneration caused by calcification, such as calcification of a congenitally bicuspid

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-79-

aortic valve, and mitral annular calcification, and myxomatous degeneration of the mitral valve (mitral valve prolapse), rheumatic fever and rheumatic heart disease, infective endocarditis, and noninfected vegetations, such as nonbacterial thrombotic endocarditis and endocarditis of systemic lupus erythematosus (Libman-Sacks disease), carcinoid heart disease, and complications of artificial valves; myocardial disease, including but not limited to dilated cardiomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy, restrictive cardiomyopathy, and myocarditis; pericardial disease, including but not limited to, pericardial effusion and hemopericardium and pericarditis, including acute pericarditis and healed pericarditis, and rheumatoid heart disease; neoplastic heart disease, including but not limited to, primary cardiac tumors, such as myxoma, lipoma, papillary fibroelastoma, rhabdomyoma, and sarcoma, and cardiac effects of noncardiac neoplasms; congenital heart disease, including but not limited to, left-to-right shunts--late cyanosis, such as atrial septal defect, ventricular septal defect, patent ductus arteriosus, and atrioventricular septal defect, right-to-left shunts--early cyanosis, such as tetralogy of fallot, transposition of great arteries, truncus arteriosus, tricuspid atresia, and total anomalous pulmonary venous connection, obstructive congenital anomalies, such as coarctation of aorta, pulmonary stenosis and atresia, and aortic stenosis and atresia, disorders involving cardiac transplantation, and congestive heart failure.

[00327] Disorders involving blood vessels include, but are not limited to, responses of vascular cell walls to injury, such as endothelial dysfunction and endothelial activation and intimal thickening; vascular diseases including, but not limited to, congenital anomalies, such as arteriovenous fistula, atherosclerosis, and hypertensive vascular disease, such as hypertension; inflammatory disease--the vasculitides, such as giant cell (temporal) arteritis, Takayasu arteritis, polyarteritis nodosa (classic), Kawasaki syndrome (mucocutaneous lymph node syndrome), microscopic polyanglitis (microscopic polyarteritis, hypersensitivity or leukocytoclastic angitis), Wegener granulomatosis, thromboanglitis obliterans (Buerger disease), vasculitis associated with other disorders, and infectious arteritis; Raynaud disease; aneurysms and dissection, such as abdominal aortic aneurysms, syphilitic (luetic) aneurysms, and aortic dissection (dissecting hematoma); disorders of veins and lymphatics, such as varicose veins, thrombophlebitis and phlebothrombosis, obstruction of superior vena cava (superior vena cava syndrome), obstruction of inferior vena cava (inferior vena cava syndrome), and lymphangitis and lymphedema; tumors, including benign tumors and tumor-like conditions, such as hemangioma, lymphangioma, glomus tumor (glomangioma), vascular ectasias, and bacillary angiomatosis, and intermediate-grade (borderline low-grade malignant) tumors, such as Kaposi's sarcoma and hemangioendothelioma, and malignant

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-80-

tumors, such as angiosarcoma and hemangiopericytoma; and pathology of therapeutic interventions in vascular disease, such as balloon angioplasty and related techniques and vascular replacement, such as coronary artery bypass graft surgery.

[00328] Additionally, 93870 molecules can play an important role in the etiology of certain viral diseases (e.g., liver diseases), including but not limited to Hepatitis B, Hepatitis C and Herpes Simplex Virus (HSV). Modulators of 93870 activity can be used to control viral diseases. For example, the 93870 molecules can play a role in mediating viral protease activities important for viral infection. The modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of viral infected tissue or virus-associated tissue fibrosis, especially liver and liver fibrosis. Also, 93870 modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of virus-associated carcinoma, especially hepatocellular cancer.

[00329] Hepatic disorders which can be treated or diagnosed by methods described herein include, but are not limited to, disorders associated with an accumulation in the liver of fibrous tissue, such as that resulting from an imbalance between production and degradation of the extracellular matrix accompanied by the collapse and condensation of preexisting fibers. The methods described herein can be used to diagnose or treat hepatocellular necrosis or injury induced by a wide variety of agents including processes which disturb homeostasis, such as an inflammatory process, tissue damage resulting from toxic injury or altered hepatic blood flow, and infections (e.g., bacterial, viral and parasitic). For example, the methods can be used for the early detection of hepatic injury, such as portal hypertension or hepatic fibrosis. In addition, the methods can be employed to detect liver fibrosis attributed to inborn errors of metabolism, for example, fibrosis resulting from a storage disorder such as Gaucher's disease (lipid abnormalities) or a glycogen storage disease, A1-antitrypsin deficiency; a disorder mediating the accumulation (e.g., storage) of an exogenous substance, for example, hemochromatosis (iron-overload syndrome) and copper storage diseases (Wilson's disease), disorders resulting in the accumulation of a toxic metabolite (e.g., tyrosinemia, fructosemia and galactosemia) and peroxisomal disorders (e.g., Zellweger syndrome). Additionally, the methods described herein may be useful for the early detection and treatment of liver injury associated with the administration of various chemicals or drugs, such as for example, methotrexate, isoniazid, oxyphenisatin, methyl dopa, chlorpromazine, tolbutamide or alcohol, or which represents a hepatic manifestation of a vascular disorder such as obstruction of either the intrahepatic or extrahepatic bile flow or an alteration in hepatic circulation resulting, for example, from chronic heart failure, veno-occlusive disease, portal vein thrombosis or Budd-Chiari syndrome.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-81-

[00330] Additionally, 93870 may play an important role in the regulation of metabolism or pain disorders. Diseases of metabolic imbalance include, but are not limited to, obesity, anorexia nervosa, bulimia, cachexia, lipid disorders, and diabetes. Examples of pain disorders include, but are not limited to, pain response elicited during various forms of tissue injury, e.g., inflammation, infection, and ischemia, usually referred to as hyperalgesia (described in, for example, Fields, H.L., (1987) *Pain*, New York:McGraw-Hill); pain associated with musculoskeletal disorders, e.g., joint pain; tooth pain; headaches; pain associated with surgery; pain related to irritable bowel syndrome; and chest pain.

10 Pharmacogenomics

[00331] The 93870 molecules of the present invention, as well as agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on 93870 activity (e.g., 93870 gene expression) as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) 93870-associated disorders associated with aberrant or unwanted 93870 activity (e.g., disorders associated with hematopoiesis and immune disorders). In conjunction with such treatment, pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) can be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician can consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer a 93870 molecule or 93870 modulator as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with a 93870 molecule or 93870 modulator.

[00332] Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons (e.g., Eichelbaum *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:983-985; Linder *et al.*, (1997) *Clin. Chem.* 43:254-266). In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is hemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-82-

[00333] One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association," relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (e.g., a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants). Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high-resolution map can be generated from a combination of some ten million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP can be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that can be common among such genetically similar individuals.

[00334] Alternatively, a method termed the "candidate gene approach" can be utilized to identify genes that predict drug response. According to this method, if a gene that encodes a drug's target is known (e.g., a 93870 protein of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

[00335] Alternatively, a method termed "gene expression profiling," can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (e.g., a 93870 molecule or 93870 modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

[00336] Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of an individual. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a 93870 molecule or 93870 modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-83-

[00337] The present invention further provides methods for identifying new agents, or combinations, that are based on identifying agents that modulate the activity of one or more of the gene products encoded by one or more of the 93870 genes of the present invention, wherein these products can be associated with resistance of the cells to a therapeutic agent.

5 Specifically, the activity of the proteins encoded by the 93870 genes of the present invention can be used as a basis for identifying agents for overcoming agent resistance. By blocking the activity of one or more of the resistance proteins, target cells, e.g., hematopoietic cells, will become sensitive to treatment with an agent that the unmodified target cells were resistant to.

[00338] Monitoring the influence of agents (e.g., drugs) on the expression or activity of a
10 93870 protein can be applied in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase 93870 gene expression, protein levels, or up-regulate 93870 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 93870 gene expression, protein levels, or down-regulated 93870 activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to
15 decrease 93870 gene expression, protein levels, or down-regulate 93870 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 93870 gene expression, protein levels, or up-regulated 93870 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 93870 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a 93870-associated disorder can be used as a "read out" or markers of the phenotype of a particular
20 cell.

Other Embodiments

[00339] In another aspect, the invention features a method of analyzing a plurality of
25 capture probes. The method is useful, e.g., to analyze gene expression. The method includes: providing a two dimensional array having a plurality of addresses, each address of the plurality being positionally distinguishable from each other address of the plurality, and each address of the plurality having a unique capture probe, e.g., a nucleic acid or peptide sequence, wherein the capture probes are from a cell or subject which expresses 93870 or
30 from a cell or subject in which a 93870 mediated response has been elicited; contacting the array with a 93870 nucleic acid (preferably purified), a 93870 polypeptide (preferably purified), or an anti-93870 antibody, and thereby evaluating the plurality of capture probes. Binding, e.g., in the case of a nucleic acid, hybridization with a capture probe at an address of

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-84-

the plurality, is detected, e.g., by a signal generated from a label attached to the 93870 nucleic acid, polypeptide, or antibody.

[00340] The capture probes can be a set of nucleic acids from a selected sample, e.g., a sample of nucleic acids derived from a control or non-stimulated tissue or cell.

5 **[00341]** The method can include contacting the 93870 nucleic acid, polypeptide, or antibody with a first array having a plurality of capture probes and a second array having a different plurality of capture probes. The results of each hybridization can be compared, e.g., to analyze differences in expression between a first and second sample. The first plurality of capture probes can be from a control sample, e.g., a wild type, normal, or non-diseased, non-
10 stimulated, sample, e.g., a biological fluid, tissue, or cell sample. The second plurality of capture probes can be from an experimental sample, e.g., a mutant type, at risk, disease-state or disorder-state, or stimulated, sample, e.g., a biological fluid, tissue, or cell sample.

[00342] The plurality of capture probes can be a plurality of nucleic acid probes each of which specifically hybridizes, with an allele of 93870. Such methods can be used to diagnose
15 a subject, e.g., to evaluate risk for a disease or disorder, to evaluate suitability of a selected treatment for a subject, to evaluate whether a subject has a disease or disorder.

[00343] The method can be used to detect SNPs, as described above.

[00344] In another aspect, the invention features, a method of analyzing 93870, e.g., analyzing structure, function, or relatedness to other nucleic acid or amino acid sequences.

20 The method includes: providing a 93870 nucleic acid or amino acid sequence; comparing the 93870 sequence with one or more preferably a plurality of sequences from a collection of sequences, e.g., a nucleic acid or protein sequence database; to thereby analyze 93870.

[00345] The method can include evaluating the sequence identity between a 93870 sequence and a database sequence. The method can be performed by accessing the database
25 at a second site, e.g., over the internet. Preferred databases include GenBank™ and SwissProt.

[00346] In another aspect, the invention features, a set of oligonucleotides, useful, e.g., for identifying SNP's, or identifying specific alleles of 93870. The set includes a plurality of oligonucleotides, each of which has a different nucleotide at an interrogation position, e.g., an
30 SNP or the site of a mutation. In a preferred embodiment, the oligonucleotides of the plurality identical in sequence with one another (except for differences in length). The oligonucleotides can be provided with differential labels, such that an oligonucleotides which hybridizes to one allele provides a signal that is distinguishable from an oligonucleotides which hybridizes to a second allele.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-85-

[00347] The sequence of a 93870 molecules is provided in a variety of mediums to facilitate use thereof. A sequence can be provided as a manufacture, other than an isolated nucleic acid or amino acid molecule, which contains a 93870 molecule. Such a manufacture can provide a nucleotide or amino acid sequence, e.g., an open reading frame, in a form which allows examination of the manufacture using means not directly applicable to examining the nucleotide or amino acid sequences, or a subset thereof, as they exists in nature or in purified form.

[00348] A 93870 nucleotide or amino acid sequence can be recorded on computer readable media. As used herein, "computer readable media" refers to any medium that can be read and accessed directly by a computer. Such media include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as compact disc and CD-ROM; electrical storage media such as RAM, ROM, EPROM, EEPROM, and the like; and general hard disks and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media. The medium is adapted or configured for having thereon 93870 sequence information of the present invention.

[00349] As used herein, the term "electronic apparatus" is intended to include any suitable computing or processing apparatus of other device configured or adapted for storing data or information. Examples of electronic apparatus suitable for use with the present invention include stand-alone computing apparatus; networks, including a local area network (LAN), a wide area network (WAN) Internet, Intranet, and Extranet; electronic appliances such as personal digital assistants (PDAs), cellular phones, pagers, and the like; and local and distributed processing systems.

[00350] As used herein, "recorded" refers to a process for storing or encoding information on the electronic apparatus readable medium. Those skilled in the art can readily adopt any of the presently known methods for recording information on known media to generate manufactures comprising the 93870 sequence information.

[00351] A variety of data storage structures are available to a skilled artisan for creating a computer readable medium having recorded thereon a 93870 nucleotide or amino acid sequence of the present invention. The choice of the data storage structure will generally be based on the means chosen to access the stored information. In addition, a variety of data processor programs and formats can be used to store the nucleotide sequence information of the present invention on computer readable medium. The sequence information can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and Microsoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-86-

database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like. The skilled artisan can readily adapt any number of data processor structuring formats (e.g., text file or database) in order to obtain computer readable medium having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention.

5 [00352] By providing the 93870 nucleotide or amino acid sequences of the invention in computer readable form, the skilled artisan can routinely access the sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the invention in computer readable form to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. A search
10 is used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

[00353] The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a GPCR or 93870-associated disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder,
15 wherein the method comprises the steps of determining 93870 sequence information associated with the subject and based on the 93870 sequence information, determining whether the subject has a GPCR or 93870-associated disease or disorder and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00354] The present invention further provides in an electronic system and/or in a
20 network, a method for determining whether a subject has a 93870 or GPCR-associated disease or disorder or a pre-disposition to a disease associated with 93870, wherein the method comprises the steps of determining 93870 sequence information associated with the subject, and based on the 93870 sequence information, determining whether the subject has a
25 GPCR or 93870-associated disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder, and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition. The method may further comprise the step of receiving phenotypic information associated with the subject and/or acquiring from a network phenotypic information associated with the subject.

[00355] The present invention also provides in a network, a method for determining
30 whether a subject has a GPCR or 93870-associated disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving 93870 sequence information from the subject and/or information related thereto, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to 93870 and/or corresponding to a GPCR or 93870-associated

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-87-

disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 93870 information (e.g., sequence information and/or information related thereto), and the acquired information, determining whether the subject has a GPCR or 93870-associated disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder. The method
5 may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00356] The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a GPCR or 93870-associated disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving
10 information related to 93870 (e.g., sequence information and/or information related thereto), receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network related to 93870 and/or related to a GPCR or 93870-associated disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 93870 information, and the acquired information, determining whether the subject has a GPCR or 93870-associated
15 disease or disorder or a pre-disposition to a GPCR or 93870-associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00357] The invention also includes an array comprising a 93870 sequence of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In one
20 embodiment, the array can be used to assay gene expression in a tissue to ascertain tissue specificity of genes in the array. In this manner, up to about 7600 genes can be simultaneously assayed for expression, one of which can be 93870. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

[00358] In addition to such qualitative information, the invention allows the quantitation
25 of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression in that tissue. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can be determined. In this
30 context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. Such a determination is useful, for example, to know the effect of cell-cell interaction at the level of gene expression. If an agent is administered therapeutically to treat one cell type but has an undesirable effect on another

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-88-

cell type, the invention provides an assay to determine the molecular basis of the undesirable effect and thus provides the opportunity to co-administer a counteracting agent or otherwise treat the undesired effect. Similarly, even within a single cell type, undesirable biological effects can be determined at the molecular level. Thus, the effects of an agent on expression of other than the target gene can be ascertained and counteracted.

[00359] In another embodiment, the array can be used to monitor the time course of expression of one or more genes in the array. This can occur in various biological contexts, as disclosed herein, for example development of a 93870 -associated disease or disorder, progression of 93870 -associated disease or disorder, and processes, such as a cellular transformation associated with the 93870 -associated disease or disorder.

[00360] The array is also useful for ascertaining the effect of the expression of a gene on the expression of other genes in the same cell or in different cells (*e.g.*, ascertaining the effect of 93870 expression on the expression of other genes). This provides, for example, for a selection of alternate molecular targets for therapeutic intervention if the ultimate or downstream target cannot be regulated.

[00361] The array is also useful for ascertaining differential expression patterns of one or more genes in normal and abnormal cells. This provides a battery of genes (*e.g.*, including 93870) that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

[00362] As used herein, a "target sequence" can be any DNA or amino acid sequence of six or more nucleotides or two or more amino acids. A skilled artisan can readily recognize that the longer a target sequence is, the less likely a target sequence will be present as a random occurrence in the database. Typical sequence lengths of a target sequence are from about 10 to 100 amino acids or from about 30 to 300 nucleotide residues. However, it is well recognized that commercially important fragments, such as sequence fragments involved in gene expression and protein processing, may be of shorter length.

[00363] Computer software is publicly available which allows a skilled artisan to access sequence information provided in a computer readable medium for analysis and comparison to other sequences. A variety of known algorithms are disclosed publicly and a variety of commercially available software for conducting search means are and can be used in the computer-based systems of the present invention. Examples of such software include, but are not limited to, MacPattern (EMBL), BLASTN and BLASTX (NCBI).

[00364] Thus, the invention features a method of making a computer readable record of a sequence of a 93870 sequence which includes recording the sequence on a computer readable matrix. In a preferred embodiment the record includes one or more of the following:

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-89-

identification of an ORF; identification of a domain, region, or site; identification of the start of transcription; identification of the transcription terminator; the full length amino acid sequence of the protein, or a mature form thereof; the 5' end of the translated region.

5 [00365] In another aspect, the invention features, a method of analyzing a sequence. The method includes: providing a 93870 sequence, or record, in computer readable form; comparing a second sequence to the 93870 sequence; thereby analyzing a sequence. Comparison can include comparing to sequences for sequence identity or determining if one sequence is included within the other, e.g., determining if the 93870 sequence includes a sequence being compared. In a preferred embodiment the 93870 or second sequence is stored
10 on a first computer, e.g., at a first site and the comparison is performed, read, or recorded on a second computer, e.g., at a second site. E.g., the 93870 or second sequence can be stored in a public or proprietary database in one computer, and the results of the comparison performed, read, or recorded on a second computer. In a preferred embodiment the record includes one or more of the following: identification of an ORF; identification of a domain,
15 region, or site; identification of the start of transcription; identification of the transcription terminator; the full length amino acid sequence of the protein, or a mature form thereof; the 5' end of the translated region.

[00366] The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are incorporated herein by reference.

20

EXEMPLIFICATION

Gene Expression Analysis

25 [00366] Total RNA was prepared from various human tissues by a single step extraction method using RNA STAT-60 according to the manufacturer's instructions (TelTest, Inc). Each RNA preparation was treated with DNase I (Ambion) at 37°C for 1 hour. DNase I treatment was determined to be complete if the sample required at least 38 PCR amplification cycles to reach a threshold level of fluorescence using β -2 microglobulin as an internal
30 amplicon reference. The integrity of the RNA samples following DNase I treatment was confirmed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. After phenol extraction cDNA was prepared from the sample using the SUPERSRIPT™ Choice System following the manufacturer's instructions (GibcoBRL). A negative control of RNA without reverse transcriptase was mock reverse transcribed for each RNA sample.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-90-

[00367] Human 93870 expression was measured by TaqMan[®] quantitative PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems) in cDNA prepared from a variety of normal and diseased (e.g., cancerous) human tissues or cell lines.

[00368] Probes were designed by PrimerExpress software (PE Biosystems) based on the sequence of the human 93870 genes. Each human 93870 gene probe was labeled using FAM (6-carboxyfluorescein), and the β 2-microglobulin reference probe was labeled with a different fluorescent dye, VIC. The differential labeling of the target gene and internal reference gene thus enabled measurement in same well. Forward and reverse primers and the probes for both β 2-microglobulin and target gene were added to the TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). Although the final concentration of primer and probe could vary, each was internally consistent within a given experiment. A typical experiment contained 200nM of forward and reverse primers plus 100nM probe for β -2 microglobulin and 600 nM forward and reverse primers plus 200 nM probe for the target gene. TaqMan matrix experiments were carried out on an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). The thermal cycler conditions were as follows: hold for 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by two-step PCR for 40 cycles of 95°C for 15 sec followed by 60°C for 1 min.

[00369] The following method was used to quantitatively calculate human 93870 gene expression in the various tissues relative to β -2 microglobulin expression in the same tissue. The threshold cycle (Ct) value is defined as the cycle at which a statistically significant increase in fluorescence is detected. A lower Ct value is indicative of a higher mRNA concentration. The Ct value of the human 93870 genes is normalized by subtracting the Ct value of the β -2 microglobulin gene to obtain a Δ Ct value using the following formula: Δ Ct = Ct_{human 93870} - Ct _{β -2 microglobulin}. Expression is then calibrated against a cDNA sample showing a comparatively low level of expression of the human 93870 gene. The Δ Ct value for the calibrator sample is then subtracted from Δ Ct for each tissue sample according to the following formula: $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{sample} - Δ Ct_{calibrator}. Relative expression is then calculated using the arithmetic formula given by $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Expression of the target human 93870 genes in each of the tissues tested is then graphically represented as discussed in more detail below.

[00370] The results indicate high levels of 93870 expression in normal bone marrow mononuclear cells and neutrophils; moderate levels of 93870 expression in human osteoblasts; and 93870 expression in megakaryocytes.

[00371] The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are incorporated herein by reference.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-91-

Equivalents

5 [00372] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-92-

What is claimed is:

1. An isolated nucleic acid molecule selected from the group consisting of:
 - a. a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 80% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3;
 - 5 b. a nucleic acid molecule comprising a fragment of at least 640 nucleotides of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3;
 - c. a nucleic acid molecule which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;
 - d. a nucleic acid molecule which encodes a fragment of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the fragment comprises at least 263 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2; and
 - 10 e. a nucleic acid molecule which encodes a naturally occurring allelic variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the nucleic acid molecule hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1 or 3, or a complement thereof, under stringent conditions.
- 20 2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which is at least 90% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.
3. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which is at least 95% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.
4. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which encodes a fragment of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the fragment comprises at least 300 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2.
- 25 5. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which is selected from the group consisting of:
 - a. a nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3; and
 - 30 b. a nucleic acid molecule which encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
6. The nucleic acid molecule of claim 1 further comprising vector nucleic acid sequences.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-93-

7. The nucleic acid molecule of claim 1 further comprising nucleic acid sequences encoding a heterologous polypeptide.
- 5 8. A host cell which contains the nucleic acid molecule of claim 1.
9. The host cell of claim 9 which is a mammalian host cell.
10. A non-human mammalian host cell containing the nucleic acid molecule of claim 1.
- 10 11. An isolated polypeptide selected from the group consisting of:
- a. a polypeptide which is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 80% identical to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a complement thereof;
 - 15 b. a naturally occurring allelic variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the polypeptide is encoded by a nucleic acid molecule which hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3; and
 - c. a fragment of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2,
 - 20 wherein the fragment comprises at least 263 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2.
12. The isolated polypeptide of claim 11, comprising a fragment which comprises at least 300 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2.
- 25 13. The isolated polypeptide of claim 11 comprising a polypeptide which is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 90% identical to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a complement thereof.
- 30 14. The isolated polypeptide of claim 11 comprising a polypeptide which is encoded by a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a complement thereof.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-94-

15. The isolated polypeptide of claim 11 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
16. The polypeptide of claim 11 further comprising heterologous amino acid sequences.
- 5 17. An antibody which selectively binds to a polypeptide of claim 11.
18. The antibody of claim 17, which is a monoclonal antibody.
- 10 19. The antibody of claim 18, comprising an immunologically active portion selected from the group consisting of:
- a. an scFV fragment;
 - b. a dcFV fragment;
 - c. an Fab fragment; and
 - 15 d. an F(ab')₂ fragment.
20. The antibody of claim 18, wherein the antibody is selected from the group consisting of:
- a. a chimeric antibody;
 - b. a humanized antibody;
 - 20 c. a human antibody;
 - d. a non-human antibody; and
 - e. a single chain antibody.
21. A method for producing a polypeptide selected from the group consisting of:
- 25 a. a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2;
 - b. a polypeptide comprising a fragment of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the fragment comprises at least 263 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2; and
 - 30 c. a naturally occurring allelic variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or the amino acid sequence encoded by the cDNA insert of the plasmid deposited with the ATCC as Accession Number _____, wherein the polypeptide is encoded by a nucleic acid molecule which hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a complement thereof under stringent conditions;

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-95-

comprising culturing the host cell of claim 8 under conditions in which the nucleic acid molecule is expressed.

22. A method for detecting the presence of a polypeptide of claim 11 in a sample,
5 comprising:
 contacting the sample with a compound which selectively binds to a polypeptide
 of claim 11; and
 determining whether the compound binds to the polypeptide in the sample.
- 10 23. The method of claim 22, wherein the compound which binds to the polypeptide is an
 antibody.
24. A kit comprising a compound which selectively binds to a polypeptide of claim 11 and
 instructions for use.
- 15 25. A method for detecting the presence of a nucleic acid molecule of claim 1 in a sample,
 comprising the steps of:
 contacting the sample with a nucleic acid probe or primer which selectively
 hybridizes to the nucleic acid molecule; and
20 determining whether the nucleic acid probe or primer binds to a nucleic acid molecule in
 the sample.
26. The method of claim 25, wherein the sample comprises mRNA molecules and is
 contacted with a nucleic acid probe.
- 25 27. A kit comprising a compound which selectively hybridizes to a nucleic acid molecule of
 claim 1 and instructions for use.
28. A method for identifying a compound which binds to a polypeptide of claim 11
30 comprising the steps of:
 contacting a polypeptide, or a cell expressing a polypeptide of claim 11 with a test
 compound; and
 determining whether the polypeptide binds to the test compound.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

-96-

29. The method of claim 28, wherein the binding of the test compound to the polypeptide is detected by a method selected from the group consisting of:
- a. detection of binding by direct detecting of test compound/polypeptide binding;
 - b. detection of binding using a competition binding assay; and
 - 5 c. detection of binding using an assay for 93870-mediated signal transduction.
30. A method for modulating the activity of a polypeptide of claim 11 comprising contacting a polypeptide or a cell expressing a polypeptide of claim 11 with a compound which binds to the polypeptide in a sufficient concentration to modulate the activity of the
- 10 polypeptide.
31. A method for identifying a compound which modulates the activity of a polypeptide of claim 11, comprising:
- contacting a polypeptide of claim 11 with a test compound; and
 - 15 determining the effect of the test compound on the activity of the polypeptide to thereby identify a compound which modulates the activity of the polypeptide.

WO 02/070657

PCT/US02/06455

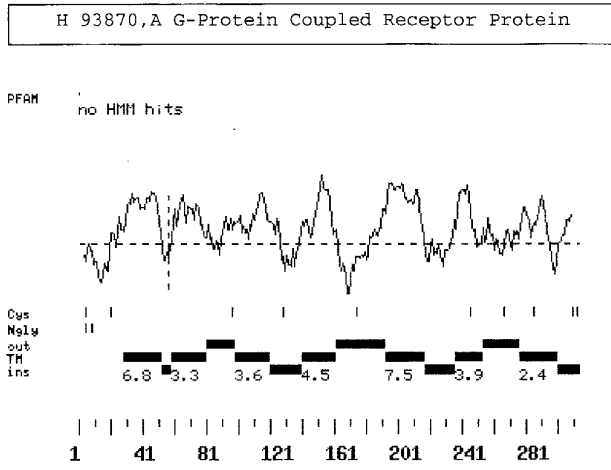


FIGURE 1

WO 02/070657

PCT/US02/06455

SEQUENCE LISTING

<110> GLUCKSMANN, MARIA ALEXANDRA
 <120> 93870, A HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USES THEREFOR
 <130> MPI2001-021
 <150> 60/272,677
 <151> 2001-03-01
 <160> 5
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 1684
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (147)...(1085)
 <223> The nucleotide at position 1384 can be any nucleotide
 <400> 1
 tcgacagggtg acacaatttt ccaactatc tcttagcaat gattttcaac aattataaaa 60
 tggaaattgt agacbggata agagatgctc agctaaaggga gtctctggat ggctttaga 120
 ttgatacacc aatcctctga aattgc atg caa aaa tgt gac ttc cca agt atg 173
 Met Gln Lys Cys Asp Phe Pro Ser Met
 1 5
 cct ggc cac aat acc tcc agy aat tcc tct tgc gat cct ata gtg aca 221
 Pro Gly His Asn Thr Ser Arg Asn Ser Ser Cys Asp Pro Ile Val Thr
 10 15 20 25
 ccc cac tta atc agc ctc tac ttc ata gtg ctt att ggc ggg ctg gtg 269
 Pro His Leu Ile Ser Leu Tyr Phe Ile Val Leu Ile Gly Gly Leu Val
 30 35 40
 ggt gtc att tcc att ctt ttc ctc ctg gtg aaa atg aac acc cgg tca 317
 Gly Val Ile Ser Ile Leu Phe Leu Leu Val Lys Met Asn Thr Arg Ser
 45 50 55
 gtg acc acc atg gcg gtc att aac ttg gtg gtg gtc cac agc gtt ttt 365
 Val Thr Thr Met Ala Val Ile Asn Leu Val Val Val His Ser Val Phe
 60 65 70
 ctg ctg aca gtg cca ttt cgc ttg acc tac ctc atc aag aag act tgg 413
 Leu Leu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Tyr Leu Ile Lys Lys Thr Trp
 75 80 85
 atg ttt ggg ctg ccc ttc tgc aaa ttt gtg agt gcc atg ctg cac atc 461
 Met Phe Gly Leu Pro Phe Cys Lys Phe Val Ser Ala Met Leu His Ile
 90 95 100 105
 cac atg tac ctc acg ttc cta ttc tat gtg gtc atc ctg gtc acc aga 509

WO 02/070657

PCT/US02/06455

His Met Tyr Leu Thr Phe Leu Phe Tyr Val Val Ile Leu Val Thr Arg
110 115 120
tac ctc atc ttc ttc aag tgc aaa gac aaa gtg gaa ttc tac aga aaa 557
Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Cys Lys Asp Lys Val Glu Phe Tyr Arg Lys
125 130
ctg cat gct gtg gct gcc agt gct ggc atg tgg acg ctg gtg att gtc 605
Leu His Ala Val Ala Ala Ser Ala Gly Met Trp Thr Leu Val Ile Val
140 145 150
att gtg gta ccc ctg gtt gtc tcc cgg tat gga atc cat gag gaa tac 653
Ile Val Val Pro Leu Val Val Ser Arg Tyr Gly Ile His Glu Glu Tyr
155 160 165
aat gag gag cac tgt ttt aaa ttt cac aaa gag ctt gct tac aca tat 701
Asn Glu Glu His Cys Phe Lys Phe His Lys Glu Leu Ala Tyr Thr Tyr
170 175 180 185
gtg aaa atc atc aac tat atg ata gtc att ttt gtc ata gcc gtt gct 749
Val Lys Ile Ile Asn Tyr Met Ile Val Ile Phe Val Ile Ala Val Ala
190 195 200
gtg att ctg ttg gtc ttc cag gtc ttc atc att atg ttg atg gtg cag 797
Val Ile Leu Leu Val Phe Gln Val Phe Ile Ile Met Leu Met Val Gln
205 210 215
aag cta cgc cac tct tta cta tcc cac cag gag ttc tgg gct cag ctg 845
Lys Leu Arg His Ser Leu Leu Ser His Gln Glu Phe Trp Ala Gln Leu
220 225 230
aaa aac cta ttt ttt ata ggg gtc atc ctt gtt tgt ttc ctt ecc tac 893
Lys Asn Leu Phe Phe Ile Gly Val Ile Leu Val Cys Phe Leu Pro Tyr
235 240 245
cag ttc ttt agg atc tat tac ttg aat gtt gtg acg cat tcc aat gcc 941
Gln Phe Phe Arg Ile Tyr Tyr Leu Asn Val Val Thr His Ser Asn Ala
250 255 260 265
tgt agc agc aag gtt gca ttt tat aac gaa atc ttc ttg agt gta aca 989
Cys Ser Ser Lys Val Ala Phe Tyr Asn Glu Ile Phe Leu Ser Val Thr
270 275 280
gca att agc tgc tat gat ttg ctt ctc ttt gtc ttt ggg gga agc cat 1037
Ala Ile Ser Cys Tyr Asp Leu Leu Leu Phe Val Phe Gly Gly Ser His
285 290 295
tgg ttt aag caa aag ata att gcc tta tgg aat tgt gtt ttg tgc cgt 1085
Trp Phe Lys Gln Lys Ile Ile Gly Leu Trp Asn Cys Val Leu Cys Arg
300 305 310

tagccacaaa ctacagatatt catatttgct tcctttatat tgggaataaaa atgggtatag 1145
gggaggtaaag aatggatatt cattacttga tcaaaacctt gcccttgatgt acccaaaaca 1205
aaaagactat aaaaatgcaag agccctcatt gtagtcctta tgggatccct cccatctctg 1265
agtgatggcc gtacaagac cagtgctggt gaaccaact gtagttgcaa tattacatta 1325
tttccagta cagaatgct gtatggcca tgaagcaaac ataggtttta agagtttta 1385
gagtttcatt agctcattct aagttcctct gtttgaagca tggctcttta ggtttggac 1445
tgaactcaga cctttagttc tttctcctcc attcaccact aggttaagtaa attctggcca 1505
ccaccagct ccaaagacac aaactctct tgcctaacca ggtagatgt cccattcate 1565
tcatgccctg ataaaaactg ataaggggag agaatagtta aaaatttttc tagggtatca 1625
taactctggt aggaagtcatt ctgtctagac tccagcaagc ttatgcatgc atcgggccg 1684

<210> 2
<211> 313

WO 02/070657

PCT/US02/06455

<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 2
Met Gln Lys Cys Asp Phe Pro Ser Met Pro Gly His Asn Thr Ser Arg
1      5      10      15
Asn Ser Ser Cys Asp Pro Ile Val Thr Pro His Leu Ile Ser Leu Tyr
20     25     30
Phe Ile Val Leu Ile Gly Gly Leu Val Gly Val Ile Ser Ile Leu Phe
35     40     45
Leu Leu Val Lys Met Asn Thr Arg Ser Val Thr Thr Met Ala Val Ile
50     55     60
Asn Leu Val Val Val His Ser Val Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Arg
65     70     75
Leu Thr Tyr Leu Ile Lys Lys Thr Trp Met Phe Gly Leu Pro Phe Cys
85     90     95
Lys Phe Val Ser Ala Met Leu His Ile His Met Tyr Leu Thr Phe Leu
100    105    110
Phe Tyr Val Val Ile Leu Val Thr Arg Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Cys
115    120    125
Lys Asp Lys Val Glu Phe Tyr Arg Lys Leu His Ala Val Ala Ala Ser
130    135    140
Ala Gly Met Trp Thr Leu Val Ile Val Ile Val Val Pro Leu Val Val
145    150    155
Ser Arg Tyr Gly Ile His Glu Glu Tyr Asn Glu Glu His Cys Phe Lys
165    170    175
Phe His Lys Glu Leu Ala Tyr Thr Tyr Val Lys Ile Ile Asn Tyr Met
180    185    190
Ile Val Ile Phe Val Ile Ala Val Ala Val Ile Leu Leu Val Phe Gln
195    200    205
Val Phe Ile Ile Met Leu Met Val Gln Lys Leu Arg His Ser Leu Leu
210    215    220
Ser His Gln Glu Phe Trp Ala Gln Leu Lys Asn Leu Phe Phe Ile Gly
225    230    235
Val Ile Leu Val Cys Phe Leu Pro Tyr Gln Phe Phe Arg Ile Tyr Tyr
245    250    255
Leu Asn Val Val Thr His Ser Asn Ala Cys Ser Ser Lys Val Ala Phe
260    265    270
Tyr Asn Glu Ile Phe Leu Ser Val Thr Ala Ile Ser Cys Tyr Asp Leu
275    280    285
Leu Leu Phe Val Phe Gly Gly Ser His Trp Phe Lys Gln Lys Ile Ile
290    295    300
Gly Leu Trp Asn Cys Val Leu Cys Arg
305    310

```

<210> 3
<211> 939
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(939)

```

<400> 3
atg caa aaa tgt gac ttc cca agt atg cct ggc cac aat acc tcc agg 48
Met Gln Lys Cys Asp Phe Pro Ser Met Pro Gly His Asn Thr Ser Arg
1      5      10      15
aat tcc tct tgc gat cct ata gtg aca ccc cac tta atc agc ctc tac 96
Asn Ser Ser Cys Asp Pro Ile Val Thr Pro His Leu Ile Ser Leu Tyr
20     25     30

```

WO 02/070657

PCT/US02/06455

```

ttc ata gtc ctt att ggc ggc ctg gtc ggt gtc att tcc att ctt ttc 144
Phe Ile Val Leu Ile Gly Gly Leu Val Gly Val Ile Ser Ile Leu Phe
35 40 45
ctc ctg gtc aaa atg aac acc cgg tca gtc acc acc atg gcg gtc att 192
Leu Leu Val Lys Met Asn Thr Arg Ser Val Thr Thr Met Ala Val Ile
50 55 60
aac ttg gtc gtc gtc cac agc gtt ttt ctg ctg aca gtc cca ttt cgc 240
Asn Leu Val Val Val His Ser Val Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Arg
65 70 75
ttg acc tac ctc atc aag aag act tgg atg ttt ggg ctg ccc ttc tgc 268
Leu Thr Tyr Leu Ile Lys Lys Thr Trp Met Phe Gly Leu Pro Phe Cys
85 90 95
aaa ttt gtc agt gcc atg ctg cac atc cac atg tac ctc acg ttc cta 336
Lys Phe Val Ser Ala Met Leu His Ile His Met Tyr Leu Thr Phe Leu
100 105 110
ttc tat gtc gtc atc ctg gtc acc aga tac ctc atc ttc ttc aag tgc 384
Phe Tyr Val Val Ile Leu Val Thr Arg Tyr Leu Ile Phe Phe Lys Cys
115 120 125
aaa gac aaa gtc gaa ttc tac aga aaa ctg cat gct gtc gct gcc agt 432
Lys Asp Lys Val Glu Phe Tyr Arg Lys Leu His Ala Val Ala Ala Ser
130 135 140
gct ggc atg tgg acg ctg gtc att gtc att gtc gta ccc ctg gtt gtc 480
Ala Gly Met Trp Thr Leu Val Ile Val Ile Val Val Pro Leu Val Val
145 150 155
tcc cgg tat gga atc cat gag gaa tac aat gag gag cac tgt ttt aaa 528
Ser Arg Tyr Gly Ile His Glu Glu Tyr Asn Glu Glu His Cys Phe Lys
165 170 175
ttt cac aaa gag ctt gct tac aca tat gtc aaa atc atc aac tat atg 576
Phe His Lys Glu Leu Ala Tyr Thr Tyr Val Lys Ile Ile Asn Tyr Met
180 185 190
ata gtc att ttt gtc ata gcc gtt gct gtc att ctg ttg gtc ttc cag 624
Ile Val Ile Phe Val Ile Ala Val Ala Val Ile Leu Leu Val Phe Gln
195 200 205
gtc ttc atc att atg ttg atg gtc cag aag cta cgc cac tct tta cta 672
Val Phe Ile Ile Met Leu Met Val Gln Lys Leu Arg His Ser Leu Leu
210 215 220
tcc cac cag gag ttc tgg gct cag ctg aaa aac cta ttt ttt ata ggg 720
Ser His Gln Glu Phe Trp Ala Gln Leu Lys Asn Leu Phe Phe Ile Gly
225 230 235
gtc atc ctt gtt tgt ttc ctt ccc tac cag ttc ttt agg atc tat tac 768
Val Ile Leu Val Cys Phe Leu Pro Tyr Gln Phe Phe Arg Ile Tyr Tyr
245 250 255
ttg aat gtt gtc acg cat tcc aat gcc tgt agc agc aag gtt gca ttt 816
Leu Asn Val Val Thr His Ser Asn Ala Cys Ser Ser Lys Val Ala Phe
260 265 270
tat aac gaa atc ttc ttg agt gta aca gca att agc tgc tat gat ttg 864
Tyr Asn Glu Ile Phe Leu Ser Val Thr Ala Ile Ser Cys Tyr Asp Leu
275 280 285

```

WO 02/070657

PCT/US02/06455

```

ctt ctc ttt gtc ttt ggg gga agc cat tgg ttt aag caa aag ata att 912
Leu Leu Phe Val Phe Gly Gly Ser His Trp Phe Lys Gln Lys Ile Ile
290 295 300

```

```

ggc tta tgg aat tgt gtt ttg tgc cgt 939
Gly Leu Trp Asn Cys Val Leu Cys Arg
305 310

```

```

<210> 4
<211> 356
<212> PRT
<213> Mus muscalis

```

```

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

```

<210> 5

WO 02/070657

PCT/US02/06455

<211> 68
 <212> PRT
 <213> Mus muscalis

<400> 5
 Arg Asn Met Thr Ser Ile Tyr Leu Phe Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 Val Phe Leu Ser Thr Leu Pro Phe Trp Val Asp Tyr Ile Met Lys Gly
 20 25 30
 Asp Trp Ile Phe Gly Asn Ala Met Cys Lys Phe Val Ser Gly Phe Tyr
 35 40 45
 Tyr Leu Gly Leu Tyr Ser Asp Met Phe Phe Ile Thr Leu Leu Thr Ile
 50 55 60
 Asp Arg Tyr Leu
 65

<210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> The amino acid at position 1 can be S or T or A or
 L or I or V or M or F or Y or W or C

<221> VARIANT
 <222> (2)...(2)
 <223> The amino acid at position 2 can be S or T or A or
 N or P or D or E

<221> VARIANT
 <222> (3)...(3)
 <223> The amino acid at position 3 can not be E or D or
 P or K or R or H

<223> The amino acid at position 4 and at position 5 can
 be any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (6)...(6)
 <223> The amino acid at position 6 can be I or V or M or
 N or Q or G or A

<223> The amino acid at position 7 and at position 8 can
 be any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> The amino acid at position 9 can be I or V or M or
 F or T

<221> VARIANT
 <222> (10)...(10)
 <223> The amino acid at position 10 can be S or T or A or
 N or C

<221> VARIANT
 <222> (11)...(11)
 <223> The amino acid at position 11 can be I or V or M
 or F or Y or W or S or T or A or C

WO 02/070657

PCT/US02/06455

<221> VARIANT
 <222> (12)...(12)
 <223> The amino acid at position 12 can be E or N or H

<221> VARIANT
 <222> (14)...(14)
 <223> The amino acid at position 14 can be Y or W or C
 or S or H

<223> The amino acid at position 15 and at position 16
 can be any amino acid

<221> VARIANT
 <222> (17)...(17)
 <223> The amino acid at position 17 can be I or V or M

<400> 6
 Gly Gly Gly Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Gly Leu Asp Arg Phe Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Leu

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070657 A3(51) International Patent Classification: A61K 38/00,
39/00, 48/00, C07H 21/02, 21/04, C07K 14/00, 14/47,
G01N 33/53

(21) International Application Number: PCT/US02/06455

(22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/272,677 1 March 2001 (01.03.2001) US

(71) Applicant: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS,
INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139
(US).(72) Inventor: GLUCKSMANN, Maria, Alexandra; 33
Summit Road, Lexington, MA 02173 (US).(74) Agent: SILVERI, Jean, M.; Millennium Pharmaceuti-
cals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utili-
ty model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DI¹ (utility model), DI², DK
(utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE,
ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, IR, IU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK (utility
model), SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/070657 A3

(54) Title: 93870. A HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USIS THEREFOR

(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated 93870 nucleic acid molecules, which encode GPCRs. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing 93870 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and non-human transgenic animals in which a 93870 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated 938260 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-93870 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

【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
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/070657 A3(51) International Patent Classification: A61K 38/00,
39/00, 48/00, C07H 21/02, 21/04, C07K 14/00, 14/47,
G01N 33/53ID, 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 (utility
model), SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US02/06455

(22) International Filing Date: 28 February 2002 (28.02.2002)

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, 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:
(BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/272,677 1 March 2001 (01.03.2001) US

Published:
with international search report(71) Applicant: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS,
INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139
(US).(88) Date of publication of the international search report:
3 July 2003(72) Inventor: GLUCKSMANN, Maria, Alexandra; 33
Summit Road, Lexington, MA 02173 (US).(48) Date of publication of this corrected version:
6 November 2003(74) Agent: SILVERI, Jean, M.; Millennium Pharmaceuti-
cals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 45/2003 of 6 November 2003, Sec-
tion II(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (uti-
lity model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK
(utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE,
ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GM, GR, HU,For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/070657 A3

(54) Title: 93870. A HUMAN G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND USIS THEREFOR

(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated 93870 nucleic acid molecules, which encode GPCRs. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing 93870 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and non-human transgenic animals in which a 93870 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated 938760 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-93870 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/06455										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : A61k 38/00, 39/00, 48/00; C07H 21/02, 04; C07K 14/00, 14/47; G01N 33/53 US CL : 514/2, 44; 530/300, 350; 424/130.1, 139.1, 145.1, 192.1; 435/7.1, 69.1, 325; 536/23.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/2, 44; 530/300, 350; 424/130.1, 139.1, 145.1, 192.1; 435/7.1, 69.1, 325; 536/23.1												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
A	WO 01/36473 A2 (PHARMACIA & UPHOHN COMPANY) 25 May 2001 (25.05.01), see especially claim 4, claim 37 and attached sequence comparison.	1-31										
A	WO 02/44212 A2 (SOLVAY PHARMACEUTICALS B.V.) 06 June 2002 (06.06.02), see especially claim 1, claim 25 and attached sequence comparison..	1-31										
A	WO 01/96567 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 20 December 2001 (20.12.01), see especially claim 5 and attached sequence comparison.	1-31										
A	WO 02/26825 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 04 April 2002 (04.04.02) see especially claim 38 , claim 83 and attached sequence comparison.	1-31										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:33%">*A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width:33%">*Y* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*O* documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*Y* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*O* documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
A documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*Y* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* documents of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
O documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*A* document member of the same patent family											
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 22 March 2003 (22.03.2003)	Date of mailing of the international search report 07 APR 2003											
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Eylar Yvonne Telephone No. 703-308-1234 SUPERVISORY PATENT EXAMINER TECHNOLOGY CENTER 1600											

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/06455

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
N Geneseq 011002, US Issued Patents, GenEmbl, US Published Applications, Est, Pir 73, swissProt 40, Sptrembl 21, US Patents Full-Text, US Pre-Grant Publication Full-Text, JPO Abstracts, EPO Abstracts, Derwent World Patent Index, IBM Technical Disclosure bulletins, Medline, biosis, Scisearch, WPI/DL, Caplus, Embase
Search terms: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, g protein coupled receptor, 93870, antibody

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 7/06	A 6 1 P 7/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
C 0 7 K 14/705	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// A 6 1 K 38/00	C 1 2 N 5/00	B
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 45/00	

(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, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

ポケットベル

(72) 発明者 マリーア・アレグザンドラ・グルックスマン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 7 3 . レクシントン . サミットロード 3 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FB02

FB03

4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA01 CA12 DA02 GA11 HA12 HA20

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ53 QQ91 QR32 QR55 QS34 QX02

4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 CD04 CD20 DA01 DA13

4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 BB40 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA01 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 DC50 NA14 ZA552 ZA592

ZA682 ZA752 ZA892 ZA942 ZA962 ZB082 ZB092 ZB152 ZC352

4H045 AA10 AA11 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	人G蛋白偶联受体93870及其用途		
公开(公告)号	JP2005507638A	公开(公告)日	2005-03-24
申请号	JP2002570685	申请日	2002-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	米伦纽姆医药公司		
申请(专利权)人(译)	千年制药公司		
[标]发明人	マリーアアレグザードラグルックスマン		
发明人	マリーア・アレグザードラ・グルックスマン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P29/00 A61P37/04 A61P37/06 C07H21/04 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C07K16/46 C12N5/06 C12N5/10 C12N5/09 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P29/00 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/723		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P11/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P29/00.101 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/46 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02 A61K45/00		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DB02 2G045/DB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QQ91 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CD04 4B064/CD20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB40 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB152 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	60/272677 2001-03-01 US		
其他公开文献	JP2005507638A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码GPCR的分离的核酸分子，称为93870核酸分子。本发明还提供了反义核酸分子，含有93870核酸分子的重组表达载体，已将表达载体引入其中的宿主细胞，以及已引入或破坏了93870基因的非人转基因动物。本发明还提供分离的93870蛋白，融合蛋白，抗原肽和抗93870抗体。还提供了利用本发明的组合物的诊断和治疗方法。

