

(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2005-508168

(P2005-508168A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 2 G O 4 5
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C O 7 K 16/40	C O 7 K 16/40	4 B O 5 0
C O 7 K 16/46	C O 7 K 16/46	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/12	4 B O 6 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 246 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-538341 (P2003-538341)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年10月24日 (2002.10.24)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月21日 (2004.4.21)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034037		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/035840		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)		アメリカ合衆国02139マサチューセッ
(31) 優先権主張番号	60/338, 690		ツ州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年10月24日 (2001.10.24)		ート40番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 69583および85924、新規なヒトプロテインキナーゼファミリーメンバーおよびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、新規なプロテインキナーゼファミリーメンバーをコードする単離された核酸分子（69583核酸分子および85924核酸分子と称される）を提供する。本発明はまた、アンチセンス核酸分子、69583核酸分子または85924核酸分子を含む組換え発現ベクター、発現ベクターが導入された宿主細胞、および非ヒトトランスジェニック動物（ここで69583遺伝子または85924遺伝子が、導入されるか破壊されている）を提供する。本発明はなおさらに、単離された69583タンパク質もしくは85924タンパク質、融合タンパク質、抗原性ペプチドおよび抗69583抗体もしくは抗85924抗体を提供する。本発明の組成物を利用する診断方法および治療方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下：

- a. 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 のヌクレオチド配列に少なくとも 70 % 同一なヌクレオチド配列を含む核酸分子；
 - b. 配列番号 1 もしくは配列番号 4 のヌクレオチド配列の少なくとも 5350 ヌクレオチドのフラグメント、または配列番号 3 もしくは配列番号 6 のヌクレオチドの少なくとも 4180 ヌクレオチドのフラグメントを含む核酸分子；
 - c. 配列番号 2 または配列番号 5 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；および
 - d. 配列番号 2 または配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体をコードする核酸分子であって、ここで該核酸分子が、ストリンジェントな条件下で、配列番号 1、3、4 もしくは 6 を含む核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする、核酸分子、
- からなる群から選択される、単離された核酸分子。

10

【請求項 2】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 のヌクレオチド配列に少なくとも 80 % 同一である、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 3】

配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 のヌクレオチド配列に少なくとも 90 % 同一である、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 4】

以下：

- a. 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む核酸；および
 - b. 配列番号 2 または配列番号 5 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、
- からなる群から選択される、請求項 1 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 5】

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 6】

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 7】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項 8】

哺乳動物宿主細胞である、請求項 7 に記載の宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、非ヒト哺乳動物宿主細胞。

【請求項 10】

以下：

- a. 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む核酸に少なくとも 70 % 同一であるヌクレオチド配列またはその相補体を含む核酸分子によりコードされるポリペプチド；および
 - b. 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで該ポリペプチドが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 を含む核酸分子にハイブリダイズする核酸分子によりコードされる、対立遺伝子改変体、
- からなる群から選択される、単離されたポリペプチド。

40

【請求項 11】

請求項 10 に記載の単離されたポリペプチドであって、配列番号 1、配列番号 3、配列番号

50

号 4 もしくは配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む核酸に対して少なくとも 80 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む核酸分子によりコードされるポリペプチドを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の単離されたポリペプチドであって、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 もしくは配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む核酸に対して少なくとも 90 % 同一であるヌクレオチド配列、またはその相補体を含む核酸分子によりコードされるポリペプチドを含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 13】

配列番号 2 または配列番号 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の単離されたポリペプチド。 10

【請求項 14】

異種アミノ酸配列をさらに含む、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 10 のポリペプチドに選択的に結合する、抗体。

【請求項 16】

モノクローナル抗体である、請求項 15 に記載の抗体。

【請求項 17】

以下：

- a. scFV フラグメント；
- b. dcFV フラグメント；
- c. Fab フラグメント；および
- d. F(ab')₂ フラグメント、

からなる群から選択される、免疫学的に活性な部分を含む、請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 18】

以下：

- a. キメラ抗体；
- b. ヒト化抗体；
- c. ヒト抗体；
- d. 非ヒト抗体；および
- e. 単鎖抗体、

からなる群から選択される、請求項 16 に記載の抗体。 30

【請求項 19】

以下：

- a. 配列番号 2 または配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチド；および
- b. 配列番号 2 または配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体であって、ここで該ポリペプチドは、ストリンジェントな条件下で、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 を含む核酸分子またはその相補体にハイブリダイズする核酸分子またはその相補体によりコードされる、天然に存在する対立遺伝子改変体、

からなる群から選択されるポリペプチドを産生する方法であって、

該方法は、前記核酸分子が発現される条件下で、請求項 7 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。 40

【請求項 20】

サンプル中の請求項 10 に記載のポリペプチドの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

該サンプルを、請求項 10 に記載のポリペプチドと選択的に結合する化合物と接触させる工程；および

該化合物が該サンプル中のポリペプチドと結合するか否かを決定する工程、を包含する、方法。 50

【請求項 2 1】

前記ポリペプチドに結合する化合物が、抗体である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 0 に記載のポリペプチドに選択的に結合する化合物および使用のための指示書を備える、キット。

【請求項 2 3】

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であって、該方法は、以下の工程：

該サンプルを、該核酸分子と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接触させる工程；および

該核酸プローブまたはプライマーが、該サンプル中の核酸分子と結合するか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 2 4】

前記サンプルが、m R N A 分子を含み、そして核酸プローブと接触される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

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、および使用のための指示書を備える、キット。

【請求項 2 6】

請求項 1 0 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であって、該方法は、以下の工程：

ポリペプチド、または請求項 1 2 に記載のポリペプチドを発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；および

該ポリペプチドが、該試験化合物に結合するか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の方法であって、ここで、前記試験化合物の前記ポリペプチドに対する結合が、以下：

a. 試験化合物／ポリペプチド結合の直接的検出による結合の検出；

b. 競合結合アッセイを使用する結合の検出；および

c. 6 9 5 8 3 媒介シグナル伝達または 8 5 9 2 4 媒介シグナル伝達についてのアッセイを使用する結合の検出、

からなる群から選択される方法により検出される、方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 0 に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、請求項 1 0 に記載のポリペプチドまたは請求項 1 0 に記載のポリペプチドを発現する細胞を、該ポリペプチドの活性を調節するために十分な濃度で、該ポリペプチドに結合する化合物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項 2 9】

請求項 1 0 に記載のポリペプチドの活性を調節する化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：

請求項 1 0 に記載のポリペプチドを、試験化合物と接触させる工程；および

該ポリペプチドの活性に対する該試験化合物の効果を決定して、それにより該ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定する、工程、

を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

(関連出願の引用)

10

20

30

40

50

本出願は、米国特許仮出願番号 60/338,690 (2001 年 10 月 24 日出願、その内容は、本明細書中に参考として援用される) の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

タンパク質と密接に結合したホスフェートは、19 世紀後半から公知である。その後、タンパク質に対するホスフェートの種々の共有結合が見出されている。最も一般的なものには、セリン、スレオニン、およびチロシンに対するホスフェートのエステル化があり、少数が、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびシステインに結合される。リン酸化タンパク質の出現は、タンパク質上のアミノ酸残基をリン酸化し得る 1 つ以上のプロテインキナーゼの存在、およびまたタンパク質上のリン酸化アミノ酸残基を加水分解し得るプロテインホスファターゼの存在を示唆する。 10

【0003】

プロテインキナーゼは、細胞増殖および分裂に関連する、生化学的变化および形態変化の調節において重要な役割を果たす (D'Ursio, G. ら (1990) *Science* 250:786-791; Birchmeier, C. ら (1993) *Bioessays* 15:185-189)。それらは、増殖因子レセプターおよびシグナル伝達物質として働き、細胞のトランスフォーメーションおよび悪性疾患に関連している (Hunter, T. ら (1992) *Cell* 70:375-387; Posada, J. ら (1992) *Mol. Biol. Cell* 3:583-592; Hunter, T. ら (1994) *Cell* 79:573-582)。例えば、プロテインキナーゼは、増殖因子レセプターからのシグナル伝達 (Sturgill, T. W. ら (1988) *Nature* 344:715-718; Gomez, N. ら (1991) *Nature* 353:170-173)、細胞が有糸分裂状態に入ることの制御 (Nurse, P. (1990) *Nature* 344:503-508; Maller, J. L. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:269-275) およびアクチンの束形成 (bundling) の調節 (Husain-Chishti, A. ら (1988) *Nature* 334:718-721) に関与することが示されている。プロテインキナーゼは、アミノ酸配列の類似性、またはセリン/スレオニンもしくはチロシン残基のいずれかに対する特異性のいずれかに基づいて、2 つの大きな群に分けられ得る。少数の二重特異性キナーゼは、セリン/スレオニン特異的群に構造的に類似している。広い分類内では、キナーゼは、そのメンバーが、高い程度の触媒性ドメインアミノ酸配列同一性を共有し、類似の生化学的特性もまた有するファミリーにさらに下位分類され得る。大部分のプロテインキナーゼファミリーのメンバーはまた、それらの特定の細胞役割を反映するキナーゼドメイン以外に構造的特徴を共有する。これらとしては、キナーゼ活性または他のタンパク質との相互作用を制御する調節ドメインが挙げられる (Hanks, S. K. ら (1988) *Science* 241:42-52)。 30

【0004】

細胞外シグナル調節キナーゼ/マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (ERK/MAPK) およびサイクリン指向性キナーゼ (Cdk) は、セリン-スレオニンキナーゼの 2 つの大きなファミリーを代表する (Songyang ら (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:6486-6493 を参照のこと)。両方の型のキナーゼが、細胞外刺激に応答して、細胞増殖、細胞分裂、および細胞分化において機能する。ERK/MAPK ファミリーメンバーは、細胞内シグナル伝達経路に関与する重要なものである。上流活性化因子および ERK/MAPK 成分は、成長因子もしくはホルモンとの細胞の接触後に、または細胞ストレス (例えば、熱、紫外光および炎症性サイトカイン) に応答して、リン酸化される。これらのキナーゼは、上流キナーゼにより形質膜から細胞質まで中継されたメッセージを、核に輸送し、ここでこれらは、転写因子をリン酸化し、そして遺伝子転写調節を行う (Karin ら、(1995) *Curr. Biol.* 5:747-757)。ERK/MAPK ファミリーの基質としては、c-fos、c-jun、APF2、 50

およびETSのファミリーメンバーであるElk1、Sap1a、およびc-Ets-1が挙げられる(Brottら(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:963-968に引用される)。

【0005】

セリン／スレオニンキナーゼのERK／MAPKファミリーのメンバーを使用するシグナル伝達経路は、真核生物間で広く保存されている。これらの経路の多様性は、細胞増殖からアポトーシスにいたる広範な一連の応答を開始することによる多様な細胞外刺激に、この細胞が応答することを可能にする。ERK／MAPK経路は、3層のコアシグナル伝達モジュールから構成され、ここでERK／MAPKは、MAPK／ERKキナーゼ(MEK)により調節され、次いでMEKが、MAPKキナーゼキナーゼ(MAPKK)により調節される。哺乳動物ストレス活性化ERK／MAPK経路は、多数の重要な生理学的機能(細胞成長および細胞増殖、炎症性応答、ならびにアポトーシスを含む)に関与してきた。例えば、腫瘍プロモーターであるマイトジェン成長因子または形質転換によるERK1、2シグナル伝達経路の活性化は、線維芽細胞におけるデコリン遺伝子発現を抑制し、これが次いで、正常細胞および悪性細胞の増殖および遊走を促進し得る(Laineら、(2000)Biochem. J. 349:19-25)。

10

【0006】

Cdkは、細胞周期の連続した段階間の移行を調節する。これらの分子の活性は、リン酸化事象により、そしてサイクリンとの結合により制御される。Cdk活性は、阻害性低分子の結合によりネガティブに調節される(Dynlacht(1997)Nature 389:148-152)。Cdk標的としては、種々の転写活性化因子(例えば、p110Rb、p107)、および転写因子(例えば、p53、E2FおよびRNAポリメラーゼII)、ならびに種々の細胞骨格タンパク質および細胞質シグナル伝達タンパク質が挙げられる(Brottら(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:963-968に引用される)。

20

【0007】

プロテインキナーゼは、細胞成長、特に細胞の増殖、分化およびアポトーシスに関するシグナルの伝達において重要な役割を果たす。従って、新規なプロテインキナーゼポリヌクレオチドおよびタプロテインキナーゼンパク質は、細胞の増殖、分化および／または発達を調節するために有用である。

30

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、2つの新規なプロテインキナーゼファミリーメンバー(本明細書中で「69583」および「85924」と呼ばれる)の発見に一部基づく。69583をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1に示され、そして69583ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2に示される。さらに、69583のコード領域のヌクレオチド配列は、配列番号3に示される。85924をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、配列番号4に示され、そして85924ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5に示される。さらに、85924のコード領域のヌクレオチド配列は、配列番号6に示される。

40

【0009】

従って、1つの局面において、本発明は、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583ポリペプチドもしくは85924ポリペプチド(例えば、この69583タンパク質または85924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。好ましい実施形態において、単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号5のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。他の実施形態において、本発明は、単離された69583核酸分子または85924核酸分子を提供し、これらの核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6において示さ

50

れるヌクレオチド配列を有する。なお他の実施形態において、本発明は、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に示されるヌクレオチド配列に対して実質的に同一な核酸分子（例えば、天然に存在する対立遺伝子改変体）を提供する。他の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載される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、配列番号4または配列番号6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を提供し、ここでこの核酸は、全長69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその活性フラグメントをコードする。

【0010】

関連する局面において、本発明は、本明細書中に記載される69583核酸分子または85924核酸分子を含む核酸構築物をさらに提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、ネイティブの調節配列または異種調節配列に作動可能に連結される。本発明の69583核酸分子または85924核酸分子を含む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切なベクターおよび宿主細胞）もまた含まれる。

10

【0011】

別の関連した局面において、本発明は、69583コード核酸または85924コード核酸の検出の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フラグメントを提供する。

【0012】

なお別の関連局面において、69583コード核酸分子または85924コード核酸分子に対してアンチセンスである単離された核酸分子が提供される。

20

【0013】

別の局面において、本発明は、69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチド、およびその生物学的に活性なフラグメントまたは抗原性フラグメントを特徴とし、これらは、例えば、プロテインキナーゼ関連障害または他の69583関連障害もしくは85924関連障害の処置および診断に適用可能なアッセイにおける試薬または標的として有用である。別の実施形態において、本発明は、69583活性または85924活性を有する69583タンパク質および85924タンパク質を提供する。好ましいポリペプチドは、少なくとも1つのプロテインキナーゼドメインを含む69583タンパク質および85924タンパク質であり、そして好ましくは、69583活性または85924活性（例えば、本明細書中に記載されるような69583活性または85924活性）を有する

30

【0014】

他の実施形態において、本発明は、69583ポリペプチドおよび85924ポリペプチドを提供し、例えば、以下のアミノ酸配列を有する69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドである：配列番号2または配列番号5に示されるアミノ酸配列；配列番号2または配列番号5に示されるアミノ酸配列と実質的に同一なアミノ酸配列；または本明細書中に記載されるような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、配列番号4または配列番号6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ヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされるアミノ酸配列（ここで、この核酸は、全長69583タンパク質もしくは全長85924タンパク質またはその活性なフラグメントをコードする）。

40

【0015】

関連局面において、本発明は、本明細書中に記載される69583核酸分子および85924核酸分子を含む核酸構築物をさらに提供する。

【0016】

関連局面において、本発明は、融合タンパク質を形成するための、69583ポリペプチドおよび85924ポリペプチドまたは非69583ポリペプチドおよび非85924ポリペプチドに作動可能に連結されたフラグメントを提供する。

【0017】

別の局面において、本発明は、抗体およびその抗原結合フラグメントを特徴とし、これは

50

、 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドと反応するか、より好ましくは、特異的もしくは選択的に 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドと結合する。

【0018】

別の局面では、本発明は、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節する化合物についてスクリーニングする方法を提供する。

【0019】

なお別の局面では、本発明は、例えば、本明細書中で記載されるスクリーニングにおいて同定される化合物を用いて、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するためのプロセスを提供する。特定の実施形態では、この方法は、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたは核酸の異常な活性または発現に関連する状態（例えば、プロテインキナーゼの異常かまたは欠損した機能または発現に関連する状態または障害）の処置を包含する。このような障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：呼吸器障害、細胞増殖性障害および／もしくは細胞分化障害、肺の障害、卵巣の障害、腎臓の障害、脾臓の障害、骨格筋障害、結腸障害、胸部障害、脳障害、視床下部の障害、下垂体の障害、前立腺障害、骨代謝に関連した障害、免疫（例えば、炎症）障害、心臓血管障害（内皮細胞障害を包含する）、肝臓障害、ウイルス疾患、疼痛または代謝障害。

【0020】

本発明はまた、疾患の診断を含め、生物学的サンプル中の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたは核酸分子の活性またはそれらの存在もしくは不在を決定するためのアッセイを提供する。

【0021】

さらなる局面では、本発明は、疾患の診断を含め、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたは核酸分子における遺伝的変化の存在または不在を決定するためのアッセイを提供する。

【0022】

別の局面では、本発明は、複数のアドレスを有する二次元アレイを特徴とし、この複数のアドレスの各々は、互いに複数のアドレスから位置が識別され得、そして複数のアドレスの各々は、独特の捕捉プローブ（例えば、核酸配列またはペプチド配列）を有する。複数のアドレスのうちの少なくとも1つは、6 9 5 8 3 分子または 8 5 9 2 4 分子を認識する捕捉プローブを有する。1つの実施形態では、この捕捉プローブは、核酸（例えば、6 9 5 8 3 核酸配列または 8 5 9 2 4 核酸配列に相補的なプローブ）である。別の実施形態では、この捕捉プローブは、ポリペプチド（例えば、6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドに特異的な抗体）である。また特徴とするのは、サンプルを上記のアレイと接触させ、そしてこのアレイに対するこのサンプルの結合を検出することによって、このサンプルを分析する方法である。

【0023】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0024】

（発明の詳細な説明）

（ヒト 6 9 5 8 3）

ヒト 6 9 5 8 3 配列（配列番号 1）は、非翻訳領域を含めて約 5 5 4 9 ヌクレオチド長であり、終結コドンを含め、約 3 1 1 1 ヌクレオチド（配列番号 1 のヌクレオチド 1 ～ 3 1 1 1；配列番号 3 のヌクレオチド 1 ～ 3 1 1 1）の推定メチオニン開始コード配列を含む。このコード配列は、1 0 3 6 アミノ酸のタンパク質（配列番号 2）をコードする。

【0025】

ヒト 6 9 5 8 3 は、以下の領域または他の構造的特徴を含む（P F A M 識別名、P S という接頭語および P F という接頭語のドメイン同定番号に関する一般的情報については、S

10

20

30

40

50

onnhammerら(1997) Protein 28:405-420を参照のこと) :

配列番号2のアミノ酸残基約41~100に位置する、Src相同性3ドメイン(本明細書中でSH3ドメインという)(PFAM登録番号PF00018;配列番号7);配列番号2のアミノ酸残基約124~398に位置するプロテインキナーゼドメイン(PFAM登録番号PF00069;配列番号8);配列番号2のアミノ酸約58~約60、約167~約169、約284~約286、約299~約301、約564~約566、約770~約772、約808~約810、約845~約847、約882~約884、約932~約934、約949~約951および約1022~約1024に位置する、12個のプロテインキナーゼCリン酸化部位(Prositite PS00005);配列番号2のアミノ酸約75~約78、約368~約371、約399~約402、約416~約419、約441~約444、約455~約458、約560~約563、約643~約646、約688~約691、約783~約786、約845~約848、約893~約896、約952~約955、約998~約1001および約1026~約1029に位置する、15個のカゼインキナーゼIIリン酸化部位(Prositite PS00006);配列番号2のアミノ酸約533~約536、約716~約719および約934~937に位置する、3個のcAMP/cGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位(Prositite PS00004);配列番号2のアミノ酸約282~約285、約538~約541および約565~約568に位置する、3個のN-グルコシル化部位(Prositite PS00001);配列番号2のアミノ酸約5~10、約18~約23、約33~約38、約41~約46、約90~約95、約145~約150、約205~約210、約349~約354、約355~約360、約403~約408および約784~約789に位置する、11個のN-ミリスチル化部位(Prositite PS00008);配列番号2のアミノ酸約323~約330および約716~約724に位置する、2個のチロシンキナーゼリン酸化部位(Prositite PS00007);配列番号2のアミノ酸約130~約151に位置する、1個のプロテインキナーゼATP-結合領域シグネチャー(signature)(Prositite PS00107)、ならびに配列番号2のアミノ酸約259~約271に位置する、1つのセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー(PS00108)。

10

20

30

【0026】

(ヒト85924)

ヒト85924配列(配列番号4)は、非翻訳領域を含め、約7825ヌクレオチド長であり、終結コドンを含め、約6582ヌクレオチド(配列番号4のヌクレオチド67~6648;配列番号6のヌクレオチド1~6582)の推定メチオニン開始コード配列を含む。このコード配列は、2193アミノ酸タンパク質(配列番号5)をコードする。

【0027】

ヒト85924は、以下の領域または他の構造的特徴を含む(PFAM識別名、PSという接頭語およびPFという接頭語のドメイン同定番号に関する一般的情報については、onnhammerら(1997) Protein 28:405-420を参照のこと) :

40

配列番号5のアミノ酸残基約181~439に位置する、プロテインキナーゼドメイン(PFAM登録番号PF00069;配列番号9);配列番号5のアミノ酸約67~約69、約136~約138、約154~約156、約191~約193、約250~約252、約268~約270、約323~約325、約333~約335、約517~約519、約1079~約1081、約1108~約1110、約1149~約1151、約1242~約1244、約1288~約1290、約1398~約1400、約1482~約1484、約1547~約1549、約1582~約1584、約1622~約1624、約1661~約1663、約1697~約1699、約1832~約1834、約1876~約1878、約1882~約1884、約1913~約1915、約1937~約1939、約1948~約1950、約1980~約1982、約1984~約1986

50

、約1988～約1990、約2018～約2020、約2066～約2068、約2085～約2087および約2148～約2150に位置する、34個のプロテインキナーゼCリン酸化部位（Prosite PS00005）；配列番号5のアミノ酸約31～約34、約35～約38、約154～約157、約174～約177、約203～約206、約218～約221、約492～約495、約517～約520、約600～約603、約625～約628、約1079～約1082、約1113～約1116、約1179～約1182、約1199～約1202、約1221～約1224、約1288～約1291、約1339～約1342、約1362～約1365、約1398～約1401、約1463～約1466、約1467～約1470、約1485～約1488、約1508～約1511、約1577～約1580、約1622～約1625、約1632～約1635、約1685～約1688、約1713～約1716、約1728～約1731、約1742～約1745、約1815～約1818、約1819～約1822、約1832～約1835および約2053～2056に位置する、34個のカゼインキナーゼIIリン酸化部位（Prosite PS00006）；配列番号5の約アミノ酸215～218、335～338、393～396、456～459、1106～1109、1771～1774、1879～1882および2050～2053に位置する、8個のcAMP/cGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位（Prosite PS00004）；配列番号5のアミノ酸約1817～約1820および約2045～約2048に位置する、2個のN-グルコシル化部位（Prosite PS00001）；配列番号5のアミノ酸約6～約11、約42～約47、約143～約148、約190～約195、約267～約272、約398～約403、約605～約610、約746～約751、約800～約805、約1064～約1069、約1074～約1079、約1089～約1094、約1204～約1209、約1218～約1223、約1332～約1337、約1355～約1360、約1386～約1391、約1533～約1538、約1573～約1578、約1626～約1631、約1642～約1647、約1763～約1768、約1966～約1971、約2132～約2137、約2144～約2149および約2175～約2180に位置する、26個のN-ミリスチル化部位（Prosite PS00008）；配列番号5のアミノ酸約422～約428および約1849～約1856に位置する、2個のチロシンキナーゼリン酸化部位（Prosite PS00007）；配列番号5のアミノ酸約604～約607に位置する、1個のグリコサミノグリカン結合部位（Prosite PS00002）、配列番号5のアミノ酸約252～255、約454～約457、約1242～約1245および約1876～約1879に位置する、5個のアミド化部位（Prosite PS00009）、配列番号5のアミノ酸約1523～約1525に位置する、1個のRGD細胞結合配列（Prosite PS00016）、配列番号5のアミノ酸約774～約795に位置する、1個のロイシンジッパーパターン（Prosite PS00029）、ならびに配列番号5のアミノ酸約305～約317に位置する、1個のセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー（PS00108）。

【0028】

【表1】

表1：69583および85924についての配列情報のまとめ

遺伝子	cDNA	ORF	ポリペプチド
69583	配列番号1	配列番号3	配列番号2
85924	配列番号4	配列番号6	配列番号5

【0029】

【表2】

表2：69583および85924のドメインのまとめ

遺伝子	プロテインキナーゼ	S H 3
69583	配列番号2の アミノ酸約124～約398	配列番号2の アミノ酸約41～約100
86414	配列番号5の アミノ酸約181～約439	

10

69583タンパク質および85924タンパク質は、プロテインキナーゼファミリーのメンバーで共通した顕著な数の構造特徴を含む。用語「ファミリー」は、本発明のタンパク質および核酸分子を言及する場合、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中で定義される十分なアミノ酸配列相同性またはヌクレオチド配列相同性を有する、2以上のタンパク質または核酸分子を意味する。このようなファミリーのメンバーは、天然に存在しても天然に存在しなくてもよく、同種由来でも異なる種由来でもいずれでもよい。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第1タンパク質ならびにヒト起源の他の別個のタンパク質を含み得るか、あるいは、非ヒト起源のホモログ（例えば、ラットタンパク質またはマウスタンパク質）を含み得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特徴を有し得る。

20

【0030】

本明細書中で用いられる場合、用語「プロテインキナーゼ」とは、それ自体のリン酸化状態または別の分子（例えば、タンパク質またはポリペプチド）のリン酸化状態を調節し得る、タンパク質またはポリペプチドを包含する。プロテインキナーゼは、セリン／トレオニン残基、チロシン残基、またはセリン／トレオニン残基およびチロシン残基の両方（例えば、二重特異性キナーゼ）についての特異性（すなわち、リン酸化する特異性）を有し得る。

【0031】

真核生物プロテインキナーゼは、相同なタンパク質の大きなファミリーを構成する。これらは全て、それらのキナーゼドメインの存在によって関連し、そしてそれらの基質特異性に従って、セリン／トレオニンプロテインキナーゼおよび／またはチロシンプロテインキナーゼにさらに細分類され得る。両方の種類のプロテインキナーゼは、同様の触媒ドメインを有するが、プロテインキナーゼがセリン／トレオニン残基またはチロシン残基をリン酸化するか否かを決定するのを助け得る特定のシグネチャー部位が同定されている。69583および85924のプロテインキナーゼドメインは、セリン／トレオニンならびにチロシンに特異的なこのようなシグネチャー配列を含み、それにより、69583ポリペプチドおよび85924ポリペプチドが、セリン残基、トレオニン残基および／またはチロシン残基をリン酸化し得る（すなわち、これらは、二重特異性キナーゼであるようである）ことを示唆する。

30

【0032】

プロテインキナーゼファミリーのメンバーのタンパク質は、保存された触媒領域によって特徴付けられる。この触媒領域は、さらに11個の保存された主なサブドメインに細分されている。このようなサブドメインは、活性部位の構成要素であることによって、または活性部位の作製に間接的に寄与することによって、プロテインキナーゼの触媒機能に関与し得る。11個のサブドメインの各々において、高度に保存された残基もまた同定されている。これらの多くは、ATP結合およびリン酸転移に直接的に関与する。プロテインキナーゼファミリーのメンバーのタンパク質は、代表的に、サブドメインIにおいてグリシンリッチ領域を含む。このプロテインキナーゼファミリーのメンバー中に存在する、最もよく特徴付けられた保存された残基は、サブドメインIIに通常位置するリジン残基である（Hanksら（1988）Science 241：42-52）。このリジン残基

40

50

は、ATP結合に関与することが示されている。85924のプロテインキナーゼドメインは、リジン残基をそのサブドメインIに有し、これは、そのサブドメインIIにおいて欠けている触媒性リジンの代わりをする。この特徴は、WNK1プロテインキナーゼがメンバーである、新規なクラスのセリン／トレオニンプロテインキナーゼに85924が属することを示す(Xuら(2000) Journal of Biological Chemistry 275:16795-16801)。プロテインキナーゼファミリーのメンバーのタンパク質は、触媒ドメインの中心コア内(通常、サブドメインVI内)に位置する保存されたアスパラギン酸残基を通常有し、このアスパラギン酸残基は、セリン／トレオニンキナーゼサブファミリーのタンパク質の触媒活性に重要である。

【0033】

10

69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドは、「プロテインキナーゼドメイン」または「プロテインキナーゼドメイン」と相同な領域を含み得る。69583ポリペプチドは、「SH3ドメイン」または「SH3ドメイン」と相同な領域をさらに含み得る。

【0034】

本明細書中で用いられる場合、用語「プロテインキナーゼドメイン」は、約250～約275アミノ酸残基長でかつプロテインキナーゼドメイン(HMM)に対するその配列の整列についての少なくとも200のビットスコアを有するアミノ酸配列を包含する。好ましくは、プロテインキナーゼドメインは、ATPを結合することによってリン酸化を媒介する。好ましくは、プロテインキナーゼドメインは、少なくとも約200～約325アミノ酸、より好ましくは約225～約300アミノ酸残基、または約250～約275アミノ酸を含み、そしてこのプロテインキナーゼドメイン(HMM)に対するこの配列の整列について少なくとも100、125、150、175、200以上のビットスコアを有する。このプロテインキナーゼドメインのコンセンサス配列(HMM)には、PFAM登録番号PF00069が割り当てられている(Sonnhammerら(1997) Protein 28:405-420、配列番号8および配列番号9)。ヒト69583のプロテインキナーゼドメイン(配列番号2のアミノ酸124～398)と隠れマルコフモデルから誘導されたPfamプロテインキナーゼドメインコンセンサスアミノ酸配列との整列は、302.9のビットスコアを生じた。ヒト85924のプロテインキナーゼドメイン(配列番号5のアミノ酸181～439)と、隠れマルコフモデルから誘導されたPfamプロテインキナーゼドメインコンセンサスアミノ酸配列との整列は、206.5のビットスコアを生じた。

20

30

【0035】

69583ポリペプチドおよび85924ポリペプチドは、プロテインキナーゼドメインを含む。プロテインキナーゼファミリーのメンバーは、約250～300アミノ酸残基から構成されるこのドメイン(「触媒」ドメインともいわれる)によって関連している。69583ポリペプチドのプロテインキナーゼドメインは、配列番号2の約アミノ酸残基130～151のグリシンリッチ領域を含み、この領域は、配列番号2のアミノ酸残基約151に位置する保存されたリジンと隣接する。この保存されたリジンは、プロテインキナーゼATP結合領域のシグネチャーの一部である。この保存されたシグネチャーのパターンは以下の通りである: [LIV]-G-{P}-G-{P}-[FYWMGSTNH]-[SGA]-{PW}-[LIVCAT]-{PD}-x-[GSTACLIVMFY]-x(5,18)-[LIVMFYWCSTAR]-[AIVP]-[LIVMFAGCKR]-K(ここで、「K」は、活性部位残基である)(配列番号10)。69583ポリペプチドおよび85924ポリペプチドはまた、それぞれ、チロシン残基を配列番号2のアミノ酸約330、ならびに配列番号5のアミノ酸約428および約1856に含む。このチロシンは、チロシンキナーゼリン酸化部位のシグネチャーの一部である。この保存されたシグネチャーパターンは、以下の通りである: [RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Yまたは[RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y(ここで、「Y」は、リン酸化部位である)(配列番号11および配列番号12)。69583ポリペプチドお

40

50

よび 8 5 9 2 4 ポリペプチドはまた、それぞれ、配列番号 2 のアミノ酸約 2 6 3 および配列番号 5 のアミノ酸約 3 0 9 に保存されたアスパラギン酸を含む。このアスパラギン酸は、最もセリン／トレオニン特異的キナーゼに特異的である、セリン／トレオニンプロテインキナーゼ活性部位のシグネチャーの一部である。この保存されたシグネチャーのパターンは、以下の通りである：[L I V M F Y C] - x - [H Y] - x - D - [L I V M F Y] - K - x (2) - N - [L I V M F Y C T] (3) (ここで、「D」は活性部位の残基である) (配列番号 1 3)。

【0036】

上記の保存されたシグネチャー配列、および本明細書中に記載される他のモチーフまたはシグネチャー配列では、アミノ酸についての標準的 I U P A C の 1 文字コードが用いられる。このパターンにおける各エレメントは、ダッシュ (-) によって隔てられる；角括弧 ([]) は、その位置で受け入れられる特定の残基を示す；x は、任意の残基がその位置で受け入れられることを示す；中括弧 ({ }) は、特定の残基がその位置で受け入れられないことを示す；そして丸括弧 (()) 内の数字は、伴うアミノ酸によって表される残基の数字を示す。

10

【0037】

好ましい実施形態では、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のポリペプチドまたはタンパク質は、「プロテインキナーゼドメイン」、または少なくとも約 2 0 0 ～約 3 2 5、より好ましくは、約 2 2 5 ～約 3 0 0 もしくは約 2 5 0 ～約 2 7 5 のアミノ酸残基を含みかつ「プロテインキナーゼドメイン」(例えば、ヒト 6 9 5 8 3 またはヒト 8 5 9 2 4 のプロテインキナーゼドメイン(例えば、配列番号 2 の残基 1 2 4 ～3 9 8 および配列番号 5 の残基 1 8 1 ～4 3 9) と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % の相同性を有する領域を有する。

20

【0038】

6 9 5 8 3 タンパク質配列または 8 5 9 2 4 タンパク質配列における「プロテインキナーゼ」ドメインの存在を同定し、そして目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルの有することを決定するために、このタンパク質のアミノ酸配列は、デフォルトパラメーターを用いて、HMM の P f a m データベース(例えば、P f a m データベース、2. 1 版) に対して検索され得る。例えば、h m m s f プログラム(これは、検索プログラムの H M M E R パッケージの一部として入手可能である) は、M I L P A T 0 0 6 3 についてのファミリー特異的デフォルトプログラムであり、スコア 1 5 が、ヒットを決定するためのデフォルト閾値スコアである。あるいは、ヒットを決定するための閾値スコアは、(例えば、8 ビットまで) 下げられ得る。P f a m データベースの説明は、S o n h a m m e r ら (1 9 9 7) P r o t e i n s 2 8 : 4 0 5 - 4 2 0 に見出され得、そして H M M の詳細な説明は、例えば、G r i b s k o v ら (1 9 9 0) M e t h . E n z y m o l . 1 8 3 : 1 4 6 - 1 5 9 ; G r i b s k o v ら (1 9 8 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 4 3 5 5 - 4 3 5 8 ; K r o g h ら (1 9 9 4) J . M o l . B i o l . 2 3 5 : 1 5 0 1 - 1 5 3 1 ; および S t u l t z ら (1 9 9 3) P r o t e i n S c i . 2 : 3 0 5 - 3 1 4 に見出され得る。これらの内容は、本明細書中に参考として援用される。検索を、H M M データベースに対して行い、ヒト 6 9 5 8 3 およびヒト 8 5 9 2 4 のアミノ酸配列において、それぞれ、配列番号 2 の残基約 1 2 4 ～約 3 9 8 および配列番号 5 の残基約 1 8 1 ～約 4 3 9 に「プロテインキナーゼ」ドメインが同定された。

30

40

【0039】

本明細書において使用される場合、用語「S H 3 ドメイン」としては、長さにおいて約 5 9 アミノ酸残基であり、そして、少なくとも、5 7. 4 である、S H 3 ドメイン (H M M) とのアミノ酸配列のアライメントに関するビットスコア (b i t s c o r e) を有する、アミノ酸配列が挙げられる。好ましくは、S H 3 ドメインは、細胞骨格の組織化に関連するシグナル伝達に関与する。好ましくは、S H 3 ドメインは、少なくとも、約 3 0 個～8 0 個のアミノ酸を含み、より好ましくは、約 4 0 個～7 0 個のアミノ酸残基、または

50

約50個～60個のアミノ酸残基を含み、そして、少なくとも、20個、30個、40個、50個、57個またはそれより大きい、プロテインキナーゼドメイン（HMM）に対するこの配列のアライメントに関するビットスコアを有する。SH3ドメインのコンセンサス配列（HMM）は、PFAM 登録番号PF00018（Sonnhammerら（1997）Protein 28:405～420；配列番号7）が割り当てられている。隠れマルコフモデルから導き出された、Pfam SH3ドメインコンセンサスアミノ酸配列を有するヒト69583のSH3ドメイン（配列番号2のアミノ酸41～100）のアライメントは、57.4というビットスコアを与えた。

【0040】

好ましい実施形態において、69583のポリペプチドまたはタンパク質は、「SH3ドメイン」、または、少なくとも、約30～80のアミノ酸残基、より好ましくは約40～70のアミノ酸残基または50～60のアミノ酸残基を含みかつ、「SH3ドメイン」（例えば、ヒト69583のSH3ドメイン（例えば、配列番号2の残基の41～100））と、少なくとも、約60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%の相同性を有している領域を有している。

【0041】

69583タンパク質配列における「SH3」の存在を同定するため、そして、目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを有していることを決定するために、このタンパク質のアミノ酸配列は、デフォルトパラメーターを使用して、HMMのPfamデータベース（例えば、Pfamデータベース、リリース2.1）に対して検索され得る。例えば、hmmsfプログラム（これは、サーチプログラムHMMERのパッケージの一部として利用可能である）が、HILPART0063にとってのファミリー特異的なデフォルトプログラムであり、15というスコアが、ヒットを決定するためのデフォルトの閾値スコアである。あるいは、ヒットを決定するための閾値スコアは、低く（例えば、8ビットまで）設定され得る。Pfamデータベースについての記載は、Sonnhammerら（1997）Proteins 28:405～420において見出され、そして、HMMの詳細な説明は、例えば、Grubskovら（1990）Meth. Enzymol. 183:146～159；Grubskovら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355～4358；Kroghら（1994）J. Mol. Biol. 235:1501～1531；およびStultzら（1993）Protein Sci. 2:305～314（これらの内容は、本明細書において、参考として援用される）において見出され得る。HMMデータベースに対するサーチが実施され、配列番号2の残基の41～100のあたりにヒト69583のアミノ酸配列における「SH3」ドメインが同定がされた。

【0042】

ヒト69583タンパク質は、コイルドコイル構造（coiled coil structure）をさらに含み得る。コイルドコイル構造は、タンパク質のオリゴマー化を担う超らせんヘリックス状ドメインである。このコイルドコイル構造には特徴的なヘプタッドリピート（h-x-x-h-x-x-x）_nが存在しており、ここで、hは、疎水性残基を表現する（BeckおよびBrodsky（1998）J. Struct. Biol. 122:17～29）。コイルドコイル構造は、広範な種類のタンパク質（細胞骨格タンパク質、核タンパク質、筋肉タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞外タンパク質、血漿タンパク質、細菌性タンパク質およびウイルス性タンパク質を含む）において見出され、そして69583ポリペプチドにおいて、配列番号2のアミノ酸の418～489あたりに見出され得る。

【0043】

85924プロテインキナーゼは、ロイシンジッパーモチーフ、またはロイシンジッパーモチーフ（Prosite PS00029）と相同性である領域をさらに含む。ロイシンジッパーは、代表的には、8個のヘリックスターンの距離に亘って、7アミノ酸ごとに配置された、少なくとも、2個、3個、4個、5個、好ましくは、6個のロイシン残基の

反復を含む。ロイシンのこれらの周期的な並びを含むセグメントは、1つの α ヘリックスから延びたロイシン側鎖が第2のポリペプチドの類似の α ヘリックスからのロイシン側鎖と相互作用する α ヘリックスコンフォメーションにおいて存在し、これによって二量体化を促進するようである。このロイシンジッパーパターンは、多くの調節タンパク質（例えば、C C A T T - b o x およびエンハンサー結合タンパク質（C / E B P）、c A M P 応答エレメント（C R E）結合タンパク質（C R E B、C R E - B P 1、A T F）、j u n / A P 1 ファミリー転写因子、C - m y c 癌遺伝子、L - m y c 癌遺伝子およびN - m y c 癌遺伝子ならびにオクタマー結合転写因子2（O c t - 2 / O T F - 2））において存在する。これらの相互作用は、タンパク質複合体の活性（例えば、遺伝子調節配列に対する結合およびその後の転写開始複合体の形成を介する核酸の転写活性化）にとって、しばしば、必要とされる。したがって、ロイシンジッパーは、インビボでのタンパク質-タンパク質相互作用、特に、マルチサブユニット転写因子（ホモダイマー、ヘテロダイマーなど）間の相互作用を媒介する。8 5 9 2 4 プロテインキナーゼにおけるロイシンジッパーは、配列番号5のアミノ酸残基7 7 4 ~ 7 9 5 において見出され得る。

10

【0044】

この8 5 9 2 4 タンパク質は、少なくとも、1つの予測されたR G D 細胞結合配列を有する。本明細書において使用される場合に、用語「R G D 細胞結合配列」は、細胞外マトリックスおよび細胞内輸送タンパク質において見出されるアミノ酸残基A r g - G l y - A s p からなる細胞接着配列をいう（R u o s l a h t i, E. (1996) Annu. R ev. Cell Dev. Biol. 12: 697-715 において概説される）。タンパク質におけるR G D 配列は、タンパク質-タンパク質相互作用を介して細胞接着を媒介し得るか、または細胞または小胞内のタンパク質間の相互作用を媒介し得る。ヒト8 5 9 2 4 のR G D 細胞接着配列は、配列番号5のアミノ酸1 5 2 3 ~ 1 5 2 5 あたりに見出され得る。

20

【0045】

6 9 5 8 3 ファミリーメンバーは、少なくとも、1つのプロテインキナーゼドメイン；および少なくとも、1つのS H 3 ドメインを含み得る。さらに、6 9 5 8 3 ファミリーメンバーは、少なくとも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、好ましくは、12個の、プロテインキナーゼCリン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 5）；少なくとも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、好ましくは、15個のカゼインキナーゼI I リン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 6）；少なくとも、1個、2個、好ましくは、3個のN-グリコシル化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 1）；少なくとも、1個、2個、好ましくは、3個のc A M P / c G M P プロテインキナーゼリン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 4）；少なくとも、1個、好ましくは、2個のチロシンキナーゼリン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 7）；ならびに少なくとも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、好ましくは、11個のN-ミリスチル化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 8）を含み得る。

30

【0046】

8 5 9 2 4 ファミリーメンバーは、少なくとも、1つのプロテインキナーゼドメインを含み得る。さらに、8 5 9 2 4 ファミリーメンバーは、少なくとも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、好ましくは34個のプロテインキナーゼCリン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 5）；少なくとも、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、好ましくは34個のカゼインキナーゼI I リン酸化部位（P r o s i t e P S 0 0 0 0 6）；少なくとも、1個、好ましくは2個のN-グリコシル化部位（P r o s

40

50

i t e P S 0 0 0 0 1) ; 少なくとも、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、好ましくは8 個のc A M P / c G M P プロテインキナーゼリン酸化部位 (P r o s i t e P S 0 0 0 0 4) ; 少なくとも、1 個のグリコサミノグリカン結合部位 (P r o s i t e P S 0 0 0 0 2) ; 少なくとも、1 個、2 個、3 個、好ましくは4 個のアミド化部位 (P r o s i t e P S 0 0 0 0 9) ; 少なくとも、1 個、好ましくは2 個のチロシンキナーゼリン酸化部位 (P r o s i t e P S 0 0 0 0 7) ; ならびに、少なくとも、1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、1 8 個、1 9 個、2 0 個、2 1 個、2 2 個、2 3 個、2 4 個、2 5 個、好ましくは2 6 個のN-ミリスチル化部位 (P r o s i t e P S 0 0 0 0 8) を含み得る。

10

【0047】

本発明の6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のポリペプチドは、6 9 5 8 3 媒介活性または8 5 9 2 4 媒介活性を調節し得るので、これらは、以下のように、プロテインキナーゼ関連疾患または他の6 9 5 8 3 関連障害もしくは8 5 9 2 4 関連障害に対する新規の診断剤および治療剤を開発するのに有用であり得る。

【0048】

本明細書において使用される場合に、インビボまたはインビトロで決定したときに、「6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 の活性」、「6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 の生物学的活性」、あるいは、「6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 の機能活性」とは、例えば、6 9 5 8 3 応答性細胞または8 5 9 2 4 応答性細胞あるいは6 9 5 8 3 基質または8 5 9 2 4 基質 (例えば、タンパク質基質) に対して6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のタンパク質分子、ポリペプチド分子、または核酸分子によって及ぼされる活性をいう。1 つの実施形態において、6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 の活性は、直接的な活性 (例えば、6 9 5 8 3 標的分子または8 5 9 2 4 標的分子との結合) である。「標的分子」または「結合パートナー」とは、6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のタンパク質が、本質として、結合または相互作用する分子である。例示的な実施形態において、6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 は、プロテインキナーゼであり、従って、その本質として、A T P 分子に結合するか、または相互作用する。

20

【0049】

6 9 5 8 3 活性または8 5 9 2 4 活性はまた、間接的な活性 (例えば、6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のレセプターとの6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のタンパク質の相互作用によって媒介される細胞シグナル伝達活性) であり得る。既知の機能の分子に対する、上述の配列の構造および類似性に基づいて、本発明の6 9 5 8 3 分子または8 5 9 2 4 分子は、プロテインキナーゼファミリーメンバーと類似の生物学的活性を有し得る。例えば、本発明の6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 のタンパク質は、以下の活性のうちの1 つ以上を有し得る: 1) 細胞レセプター (例えば、細胞増殖因子レセプター) からのシグナル伝達を調節する能力; 2) 細胞 (例えば、前駆細胞) の、有糸分裂への導入の調節をする能力; 3) 細胞分化を調節する能力; 4) 細胞死を調節する能力; 5) 細胞骨格機能 (例えば、アクチンバンドリング) を調節する能力; 6) 分子 (例えば、ヌクレオチド (例えば、アデノシントリホスフェート)) に結合する能力; 7) 基質分子 (例えば、セリン残基、スレオニン残基、および/またはトリプシン残基) をリン酸化する能力; ならびに8) (例えば、セリン/スレオニン残基またはチロシン残基において) リン酸化のための基質として作用する能力。したがって、本発明の分子は、治療薬、またはプロテインキナーゼ障害についての治療薬を開発することにおける薬物標的として使用され得る。本明細書において使用される場合に、「プロテインキナーゼ障害」は、その病因が、異常であるかまたは欠損しているプロテインキナーゼ機能またはその発現によって引起されるか、関するかまたは関与する疾患または障害である。

30

40

【0050】

本発明の6 9 5 8 3 または8 5 9 2 4 の分子は、これらの分子が発現する組織内での細胞の活性を調節し得る。例えば、6 9 5 8 3 m R N A は、肺腫瘍、卵巣腫瘍、結腸腫瘍、胸部腫瘍、腎臓、および脾臓において発現し得る。したがって、本発明の6 9 5 8 3 分子

50

は、肺、卵巣、腎臓、脾臓、結腸、胸部の障害に対する、治療剤または診断剤として作用し得る。さらに、85924 mRNAは、脾臓、骨格筋、大脳皮質、視床下部、下垂体、前立腺腫瘍、肺腫瘍、およびうっ血性心不全のサンプルにおいて、発現される。したがって、本発明の85924分子は、脾臓、骨格筋、脳、視床下部、下垂体、前立腺、肺および心臓の障害に対する治療剤または診断剤として作用し得る。

【0051】

肺の障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：先天性異常；無気肺；血管起源の疾患（例えば、肺性うっ血および水腫（これは、血流力学の肺性水腫および微小血管損傷による水腫）、成人呼吸系疾患症候群（びまん性肺胞損傷）、肺性塞栓症、出血、および梗塞、および肺性高血圧および血管硬化症；慢性閉塞性肺疾患（例えば、気腫、慢性気管支炎、気管支喘息、および気管支拡張症）；散在性間隙性（浸潤型、拘束型）疾患（例えば、じん肺症、サルコイドーシス、特発性肺性線維症、落屑性間隙性肺炎、過敏性肺炎、肺性好酸球増加（好酸球増加を伴った肺性増殖）、閉塞性（*Bronchiolitis obliterans-organizing*）肺炎、散在性肺性出血性症候群（グッドパスチャー症候群、特発性肺性ヘモジデリン沈着および他の出血性症候群を含む）、コラーゲン血管障害における肺性浸潤（*involvement*）、および肺性肺胞蛋白症）；治療（例えば、薬物誘導性肺疾患、放射線誘導性肺疾患および肺移植）の合併症；腫瘍（例えば、気管支原性癌（新生物随伴症候群、気管支肺胞癌腫、神経内分泌腫瘍（例えば、気管支カルチノイド、多種細胞（*miscellaneous*）腫瘍および転移性腫瘍を含む））；胸膜の病理状態（炎症性胸水、非炎症性胸水、気胸症および胸膜腫瘍（孤立性線維性腫瘍（胸膜線維腫）および悪性中皮腫を含む）を含む）。 10 20

【0052】

本発明の69583または85924の核酸およびタンパク質は、種々の卵巣の障害の処置および／または診断のために使用され得る。卵巣に関連する障害としては、例えば、以下が挙げられる：多嚢胞性卵巣疾患、スタインーリーヴェンサール症候群、腹膜偽性粘液腫および間質性卵胞莢膜増殖症；卵巣腫瘍（例えば、体腔上皮細胞の腫瘍、漿液性腫瘍、粘液性腫瘍、類内膜（*endometrioid*）腫瘍、明細胞腺癌腫、嚢胞腺腫（*cystadenofibroma*）、ブレンナー腫、表面上皮腫瘍；生殖細胞腫瘍（例えば、成熟（良性）奇形腫、単真皮（*monodermal*）奇形腫、未成熟悪性奇形腫、未分化胚細胞腫、内胚葉洞腫瘍、絨毛癌；性索口（*sex cord-stromal*）腫瘍（例えば、顆粒層膜細胞腫瘍、莢膜細胞腫—線維腫、雄性芽細胞腫（*androblastoma*）、ヒル細胞（*hil cell*）腫瘍および性腺芽腫）；ならびに転移性腫瘍（例えば、*Krukenberg*腫瘍）。 30

【0053】

本発明の69583または85924の核酸およびタンパク質は、種々の腎臓障害の処置しおよび／または診断を行うのに使用され得る。腎臓に関連する障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：先天性異常（腎臓嚢胞病（嚢胞性腎臓形成異常症、常染色体優性（成体）多発性嚢胞腎疾患、常染色体劣性（小児）多発性嚢胞腎疾患、および腎髄質嚢胞病（髄質海綿腎および腎症尿毒性髄質嚢胞病の合併症（*nephronophthisis-uremic medullary cystic disease complex*）が挙げられるがこれらに限定されない）、後天性（透析関連）嚢胞病（例えば、単純嚢胞）が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられるがこれらに限定されない）；糸球体損傷の病理を含む糸球体疾患（インサイチュ免疫複合体沈着（抗GBM腎炎、*Heymann*腎炎、および移植抗原に対する抗体が挙げられるがこれらに限定されない）、循環免疫複合体腎炎、糸球体細胞に対する抗体、糸球体腎炎（*glomerulonephritis*）における細胞媒介性免疫、代替の補体経路の活性化、上皮細胞損傷、および糸球体囊損傷のメディエータ（細胞メディエータおよび可溶性メディエータを含む）に関連する病理、急性糸球体腎炎（例えば、急性増殖性（連鎖球菌後、感染後）糸球体腎炎（溶連菌後糸球体腎炎および非溶連菌性急性糸球体腎炎が挙げられるがこれらに限定されない）、急速進行性（半月形）糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、膜性糸球体腎 40 50

炎（膜性腎症）、最小変化疾患（minimal change disease）（リポイドネフローゼ）、巣状分節状糸球体硬化症、膜性増殖性糸球体腎炎、IgA腎症（バージャー病）、巣状増殖性糸球体腎炎および壊死性糸球体腎炎（巣状糸球体腎炎）、遺伝性腎炎（アルポート症候群および薄膜疾患（良性家族性血尿）が挙げられるがこれらに限定されない）、慢性糸球体腎炎、全身性疾患に関連する糸球体外傷（全身性エリテマトーデス、ヘーノホーシェンライン紫斑病、細菌性心内膜炎、糖尿病性糸球体硬化症、アミロイドーシス、線維性およびイムノタクノイド（immunotactoid）糸球体腎炎が挙げられるがこれらに限定されない）、および他の全身性疾患が挙げられるがこれらに限定されない）；細管および間隙に影響を及ぼす疾患（急性細管壊死および尿細管間質性腎炎（腎盂腎炎および尿路感染症が挙げられるがこれらに限定されない）、急性腎盂腎炎、慢性腎盂腎炎および逆流性腎症、ならびに薬物および毒素によって誘導される尿細管間質性腎炎（急性薬物誘導化間質性腎炎、鎮痛性乱用腎症、非ステロイド性抗炎症薬に関連する腎症、および他の尿細管間質性疾患（尿酸腎症、高カルシウム血症および腎石灰症が挙げられるがこれらに限定されない））、および多発性骨髄腫が挙げられるがこれらに限定されない）；血管の疾患（良性腎硬化症、悪性高血圧症および加速性（accelerated）腎硬化症、腎動脈狭窄症、および血栓性細小（微小）血管症（古典的（胎児）溶血性尿毒症症候群、成人溶血性尿毒症症候群／血栓性血小板減少性紫斑病、特発性HUS／TTPが挙げられるがこれらに限定されない）、および他の血管障害（アテローム性動脈硬化症の虚血性腎疾患、アテローム塞栓症腎疾患、鎌状赤血球症腎症、びまん性皮質性壊死、および腎梗塞が挙げられるがこれらに限定されない）が挙げられる）；尿路閉塞症（閉塞性尿路疾患）；尿石症（腎石、結石）；ならびに腎臓の腫瘍（良性腫瘍（例えば、腎乳頭腺腫、腎臓線維腫または過誤腫（腎髄質性（renomedullary）間細胞腫）、血管筋脂肪腫、および膨大細胞腫）、および悪性腫瘍（腎細胞癌（副腎腫、腎臓腺癌）を含む）が挙げられるがこれらに限定されない（これは、腎盤の尿路上皮癌を含む））。

【0054】

本発明の69583または85924の核酸およびタンパク質は、種々の膵臓障害を処置および／または診断するために使用され得る。膵臓の障害または疾患としては、以下の障害が挙げられる：先天性異常のような外分泌膵臓（異所性膵臓が挙げられるがこれらの限定されない）；膵臓炎（急性膵臓炎が挙げられるがこれに限定されない）；嚢腫（偽性嚢胞が挙げられるがこれらに限定されない）；腫瘍（膵臓の嚢胞性腫瘍および癌腫が挙げられるがこれらに限定されない）；および内分泌性の膵臓の障害（例えば、真性糖尿病）；島細胞腫瘍（インスリノーマ、ガストリン産生腫瘍、および他のまれな島細胞腫瘍が挙げられるがこれらに限定されない）。

【0055】

本発明の69583および85924の核酸およびタンパク質は、種々の結腸障害を処置および／または診断するために使用され得る。この結腸に関する障害としては、以下が挙げられるが、これらの限定されない：先天性異常（例えば、閉鎖症および狭窄症）、メッケル憩室、先天性神経節細胞欠損性巨大結腸－ヒルシュスプルング病；腸炎（例えば、下痢および赤痢）、感染性腸炎（ウイルス性胃腸炎、細菌性腸炎、壊死性腸炎、抗生物質関連大腸炎（偽膜性腸炎）、ならびに膠原性大腸炎およびリンパ性大腸炎を含む）、多種細胞性腸管障害（寄生虫および原生動物を含む）、後天性免疫不全症候群、移植、薬物誘導性腸管損傷、放射性腸炎、好中球減少性大腸炎（盲腸炎）、および転換性（diversion）大腸炎；特発性炎症性腸管疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）；結腸の腫瘍（例えば、非腫瘍性ポリープ、腺種、家族性症候群、結腸直腸性発癌、結腸直腸性癌腫、およびカルチノイド腫瘍）。

【0056】

本発明の69583および85924の核酸およびタンパク質は、種々の胸部障害の処置および／または診断のために使用され得る。この胸部の障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：発達障害；炎症（急性乳房炎、末梢導管（periducta

1) 乳房炎、末梢導管乳房炎（再発性乳輪膿瘍、乳管の落屑性化生）、乳腺拡張症、脂肪壊死、肉芽腫性乳房炎、ならびにシリコン胸部移植物に関連する病理状態が挙げられるがこれらに限定されない）；線維性嚢胞；増殖性胸部疾患（上皮性過形成、硬化性腺疾患、および小管性（small duct）乳頭腫が挙げられるがこれらに限定されない）；腫瘍（間質腫瘍（例えば、線維腺腫、葉状腫瘍、および肉腫）ならびに上皮性腫瘍（例えば大管性（large duct）乳頭腫）が挙げられるがこれらに限定されない）；胸部の癌腫瘍（これは、以下を含む：インサイチュ（非浸潤性）癌腫（これは、インサイチュ管性癌腫（パジェット病を含む）およびインサイチュ小葉癌を含む）、ならびに浸潤性（invasive）（浸潤型（infiltrating））癌腫（浸潤性管性癌腫、特定の型に限定されない、浸潤性小葉癌、髄様癌、膠様（粘液性）癌、管状腺癌ならびに浸潤乳頭状癌が挙げられるがこれらに限定されない）、ならびに多種細胞性悪性新生物）。男性胸部における障害としては、女性化乳房および癌腫が挙げられるがこれらに限定されない。

【0057】

本発明の69583および85924の核酸およびタンパク質は、例えば、以下のような種々の骨格筋の障害の処置および／または診断のために使用され得る：筋ジストロフィ（例えば、デュシェーヌジストロフィ、ベッカー筋ジストロフィ、エメリーードライフス筋ジストロフィ、肢帯筋ジストロフィ、顔面肩甲上腕筋ジストロフィ、筋緊張性ジストロフィ、眼咽頭筋ジストロフィ、遠位筋ジストロフィ、および先天性筋ジストロフィ）、運動ニューロン性疾患（例えば、筋萎縮性側索硬化症、乳児期進行性脊髄性筋萎縮症、中期脊髄性筋ジストロフィ、脊髄延髄性筋ジストロフィ、および成人脊髄性筋ジストロフィ）、筋疾患（例えば、炎症性筋障害（例えば、皮膚筋炎および多発性筋炎）、先天性筋緊張症、先天性パラミオトニア、中心コア病、ネマリンミオパシー、筋細管ミオパシー、および周期性四肢麻痺）、ならびに筋肉の代謝性疾患（例えば、ホスホリラーゼ欠損、酸性マルターゼ欠損、ホスホフルクトキナーゼ欠損、脱分枝酵素欠損症、ミトコンドリアミオパシー、カルニチン欠損症、カルニチンパルミチルトランスフェラーゼ欠損症、ホスホグリセレートキナーゼ欠損症、ホスホグリセレートムターゼ欠損症、ラクテートデヒドロキナーゼ欠損症、およびミオアデニル酸デアミナーゼ欠損症）。骨格筋肉に関連する障害としては、横紋筋肉腫のような腫瘍がさらに挙げられる。

【0058】

本発明の69583核酸および85924核酸ならびに69583タンパク質および85924タンパク質は、種々の脳障害を処置および／または診断するために使用され得る。脳に影響を与える障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ニューロンに影響を与える障害、およびグリア（例えば、星状細胞、稀突起神経膠細胞、上皮細胞、および小グリア）に影響を与える障害；脳浮腫、上昇した頭蓋内圧およびヘルニア形成、ならびに水頭症；奇形および発生性疾患（例えば、神経管欠損、前脳奇形、後部窩奇形（posterior fossa anomaly）、ならびに脊髄空洞症および水脊髄症）；周産期脳傷害；脳血管疾患（例えば、低酸素に関連した脳血管疾患、虚血に関連した脳血管疾患、および梗塞に関連した脳血管疾患）（低血圧、低灌流、および低流動状態（全脳虚血および局所脳虚血）を含む）、局所血液供給の閉塞による梗塞、頭蓋内出血（脳内（実質内）出血、くも膜下出血および破裂性漿果状動脈瘤を含む）、ならびに血管奇形、高血圧性脳血管疾患（裂孔梗塞、細隙出血、および高血圧性脳障害を含む）；感染（例えば、急性髄膜炎（急性化膿性（細菌性）髄膜炎および急性無菌性（ウイルス性）髄膜炎を含む）、急性限局性化膿性感染（脳膿瘍、硬膜下蓄膿、および硬膜外膿瘍を含む）、慢性細菌性髄膜炎（結核およびマイコバクテリア症（mycobacterioses）を含む）、神経梅毒、および神経ボレリア症（ライム病）、ウイルス性髄膜炎（節足動物媒介性（Arbo）ウイルス脳炎を含む）、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（Varicella-zoster）ウイルス（帯状疱疹）、サイトメガロウイルス、ポリオ、狂犬病、およびヒト免疫不全ウイルス1（HIV-1）髄膜炎（亜急性脳炎）、空胞ミエロパシー、AIDS関連ミオパシー、末梢神経障害およ

び小児におけるAIDSを含む)、進行性多病巣性白質脳障害、亜急性硬化性汎脳炎、真菌性髄膜脳炎、神経系の他の感染性疾患;伝染性海綿状脳障害(プリオン病);脱髄疾患(多発性硬化症、異型多発性硬化症、急性播種性脳脊髄炎および急性壊死性出血性脳脊髄炎および脱髄についての他の疾患を含む);変性性疾患(例えば、大脳皮質に影響する変性性疾患(アルツハイマー病およびピック病を含む)、大脳基底核および脳幹の変性性疾患(パーキンソン症候群、特発性パーキンソン病(振せん麻痺(paralysis agitans))、進行性核上性麻痺、皮質基底部変性(corticobasal degeneration)、多発性全身性萎縮(線条体黒質変性(striatonigral degeneration)、シャイドレーガー症候群、およびオリブ橋小脳萎縮を含む)、ならびにハンティングトン病を含む);脊髄小脳変性(脊髄小脳性運動失調(フリートライヒ運動失調、および毛細血管拡張性運動失調(ataxia-telangiectasia)を含む)を含む)、運動ニューロンに影響する変性性疾患(筋萎縮性側索硬化症(運動ニューロン疾患)、延髄脊髄萎縮(ケネディ症候群)、および棘筋萎縮を含む);先天性代謝異常(例えば、白質萎縮(クラッペ病、異染性白質萎縮、副腎脳白質ジストロフィー、ペリツェーウスーメルツバッヒャー病、およびキャナヴァン病を含む)、ミトコンドリア脳ミオパシー(mitochondrial encephalomyopathy)(リー病および他のミトコンドリア脳ミオパシーを含む);毒性代謝疾患および後天性代謝疾患(ビタミン欠損(例えば、チアミン(ビタミンB₁)欠損およびビタミンB₁₂欠損)、代謝障害の神経学的後遺症(低血糖、高血糖、および肝性脳障害を含む)、毒性障害(一酸化炭素、メタノール、エタノール、および放射線(複合型メトトレキサートおよび放射線誘発性傷害を含む)を含む)を含む);腫瘍(例えば、神経膠腫(星状細胞腫(線維性(びまん性)星状細胞腫および多形性神経膠芽細胞腫(glioblastoma multiforme)、毛嚢腫性(pilocytic)星状細胞腫、多形性黄色星状膠細胞腫を含む)、ならびに脳幹神経膠腫、乏突起神経膠腫、ならびに上衣細胞腫および関連の室傍大量病変(paraventricular mass lesion)を含む)、ニューロン腫瘍、未分化型新生物(髄芽細胞腫を含む)、他の実質腫瘍(原発性脳リンパ腫(primary brain lymphoma)、生殖細胞腫瘍、および松果体実質腫瘍を含む)、髄膜腫、転移性腫瘍、新生物随伴症候群、末梢神経鞘腫瘍(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)を含む)、ならびに神経皮膚症候群(母斑症(phakomatoses))(神経線維腫症(neurofibromatosis)(1型神経線維腫症(NF1)および2型神経線維腫症(NF2)を含む)、結節硬化症、およびフォン・ヒッペル・リンダウ症候群を含む)。

【0059】

本発明の69583核酸および85924核酸ならびに69583タンパク質および85924タンパク質は、種々の視床下部障害を処置および/または診断するために使用され得る。視床下部機能不全は、疾患が両側性である場合にのみ生じる。視床下部の領域における腫瘍(例えば、頭蓋咽頭腫、視神経の神経膠腫、蝶形稜髄膜腫(sphenoid ridge meningiomas)、胚細胞腫、鞍結節髄膜腫、過誤腫、上衣腫、奇形腫)は、しばしばゆっくりと増殖し、そして症状が現れる前に大きなサイズに達成し得る。大きな腫瘍は、前頭葉および側頭葉の機能に影響し得る。視床下部は、食物の摂取および摂食行動、温度調節、睡眠サイクル、記憶および行動、渇き(thirst)および自律神経系機能を担う。従って、視床下部障害としては、体重の障害(例えば、食欲不振、肥満および/または過食症)、摂食障害(例えば、神経性食欲不振および/または神経性大食症、高血糖症および/または低血糖症)、温度調節障害(例えば、低体温症、変温症(poikilothermia))、睡眠障害(例えば、不眠、高傾眠症(hypersomnolence)、昏睡)、記憶および行動障害(例えば、記憶喪失、痴呆)、常染色体神経系疾患(例えば、低血圧、徐脈、心電図異常、心筋の壊死、間脳性てんかん)、悪液質、AIDS関連のいそう、および癌関連のいそうが挙げられる。

【0060】

本発明の69583核酸および85924核酸ならびに69583タンパク質および85924タンパク質は、種々の下垂体障害を処置および／または診断するために使用され得る。下垂体は、以下のようなホルモンを分泌する：甲状腺刺激ホルモン（TSH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、副腎皮質ホルモン（ACTH）など。これは、他の多くの内分泌腺（甲状腺、卵巣、副腎など）の活性を制御する。下垂体関連障害としては、下垂体が制御する内分泌腺の障害に加えて、とりわけ下垂体腺腫（視野の欠損を生じ得る）、動眼神経の麻痺または急性出血性梗塞、偶発腫、プロラクチノーマ、先端巨大症、クッシング症候群、頭蓋咽頭腫、トルコ鞍空虚症候群、性機能低下不全症、下垂体機能低下症、および下垂体炎が挙げられる。

【0061】

本発明の69583核酸および85924核酸ならびに69583タンパク質および85924タンパク質は、種々の前立腺障害を処置および／または診断するために使用され得る。本明細書中で使用される場合、「前立腺障害」は、例えば、男性の性的機能不全および／または泌尿症状によって特徴付けられる男性の骨盤領域に生じる異常な状態をいう。この障害は、いくつかの前立腺の共通疾患（前立腺炎、良性前立腺肥大および癌（例えば、前立腺の腺癌または癌腫）を含む）のような尿生殖器炎症（例えば、平滑筋細胞の炎症）の形態で認められ得る。

【0062】

本発明の69583核酸および85924核酸ならびに69583タンパク質および85924タンパク質は、種々の心血管障害を処置および／または診断するために使用され得る。本明細書中で用いられる場合、心臓に影響を与える障害、すなわち、「心血管疾患」または「心血管障害」は、心血管系（例えば、心臓、血管、および／または血液）に影響を与える、疾患または障害を包含する。心血管障害は、動脈圧力における不均等、心臓の機能不全、または（例えば、血栓による）血管の閉塞によって引き起こされ得る。心血管障害としては、例えば、以下のような障害が挙げられるがこれらに限定されない：動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、心肥大、虚血再灌流障害、再狭窄、動脈炎症、血管壁再形成、心室再形成、迅速心室ペーシング、冠状微小塞栓症、頻脈、徐脈、圧力過剰負荷、大動脈屈曲、冠状動脈結紮、脈管心臓病、弁の疾患（カルシウム沈着によって引き起こされる弁の変性、リウマチ性心疾患、心内膜炎、または人工弁の合併症が挙げられるがこれらに限定されない）；心房性細動、長QT症候群（long-QT syndrome）、うっ血性心不全、洞房結節機能不全（sinus node dysfunction）、アンギナ、心不全、高血圧、心房性細動、心房粗動、心膜疾患（心内膜液浸出および心膜炎が挙げられるがこれらに限定されない）；心筋症（例えば、拡張型心筋症または特発性心筋症）、心筋梗塞、冠状動脈疾患、冠状動脈痙攣、虚血性疾患、不整脈、突然の心臓死、および心血管発達障害（例えば、動静脈先天異常、動静脈瘻、レーノー症候群、神経性胸郭出口症候群、カウザルギー／反射性交感神経性ジストロフィー、血管腫、動脈瘤、海綿状様血管腫、大動脈弁狭窄、心房中隔欠損症、房室管、大動脈の縮窄、エプスタイン奇形、左心室發育不全症候群、大動脈弓の中断、僧帽弁逸脱、動脈管、開存性卵円孔、部分肺静脈還流異常（partial anomalous pulmonary venous return）、心室中隔欠損を伴う肺動脈弁閉鎖、心室中隔欠損を伴わない肺動脈弁閉鎖、胎児循環の存続、肺動脈弁狭窄、単心室、総肺静脈還流異常、大血管転位、三尖弁閉鎖、総動脈幹、心室中隔欠損）。心血管疾患または心血管障害はまた、内皮細胞障害を包含し得る。

【0063】

喘息は、起動の炎症性疾患である。喘息および気管支肺の異形成を有する患者における気道応答性亢進および過剰な平滑筋重量は共存する。キナーゼ経路（すなわち、リンパ球のプロテインキナーゼC）はまた、炎症メディエーター（これは、おそらく喘息性応答を開始しかつ永続化する）の生成を導き得る。リンパ球の活性化の間、プロテインキナーゼの役割が強調されている。気管支喘息における末梢血リンパ球のキナーゼ活性の変化は、酵素分子の調節機構での変化が原因であり得る。

10

20

30

40

50

【0064】

より詳細には、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPキナーゼ）セリン／スレオニンキナーゼスーパーファミリーは、活性化される際、細胞分裂刺激後に細胞質から核へ移行し、そして転写を始める。刺激の代わりにセリン／スレオニンキナーゼを介するマイトジェンシグナル伝達は、平滑筋増殖を刺激し、これは、気管支収縮剤誘導性の機能狭小化を増加させ得る。Hershenson MBら、(1997) Can J Physiol Pharmacol 75 (7) : 898-910。

【0065】

プロテインキナーゼ関連活性は、ケモカインによって和らげられる。ケモカインは、炎症の重要なメディエーターである。動物研究は、プロテインキナーゼに関するケモカイン作用の障害が炎症の低下を生じることを示唆する。プロテインキナーゼ経路におけるケモカインの潜在的役割を示す種々の疾患としては、以下が挙げられる：成人呼吸窮迫症候群、アロテム性動脈硬化症、炎症性腸疾患、および固形の臓器移植。(Shames BDら、(2000) Shock Jul; 14 (1) : 1-7)。プロテインキナーゼファミリーメンバーは、T細胞、B細胞および肥満細胞において見出され、そしてそれらはまた、アレルギー性気道疾患(AAD)のマウスモデルにおいて調節される。

10

【0066】

従って、本発明の69583核酸または85924核酸および69583タンパク質または85924タンパク質は、種々の免疫(例えば、炎症(例えば、呼吸炎症))障害を処置および／または診断するために使用され得る。免疫障害または免疫疾患の例としては、自己免疫疾患(例えば、真性糖尿病、関節炎(慢性関節リウマチ、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、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎)、乾癬、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患(例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎)、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、喘息、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、陰炎、直腸炎、蕁麻疹、らい逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳障害、特発性両側性進行性感音聴覚障害、再生不良性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少、多発性軟骨炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーヴンズ・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が挙げられる)、宿主対移植片病、移植症例、およびアレルギー(例えば、アトピー性アレルギー)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0067】

プロテインキナーゼはまた、悪性形質転換および腫瘍または浸潤に関連するプロセスにおいて重要な役割を果たし得る。これは、プロテインキナーゼを抗癌治療にとっての適切な潜在的な標的とする。ヒト肺癌腫LTEPa-2細胞におけるプロテインキナーゼ活性の遮断は、細胞増殖速度、軟寒天でのコロニー形成効率、ヌードマウスでの腫瘍形成、およびこれらの腫瘍細胞の腫瘍性特性を顕著に障害する(Wang XYら、(1999) Exp Cell Res Jul 10; 250 (1) : 253-63)。従って、本発明の69583核酸または85924核酸および69583タンパク質または85924

40

【0068】

細胞増殖性障害および／または細胞分化障害の例としては、癌(例えば、癌腫、肉腫、転移性障害または造血新生物障害(例えば、白血病))が挙げられる。転移性腫瘍は、多くの原発性腫瘍型から生じ得る(前立腺、結腸、肺、胸部および肝臓の起源の原発性腫瘍型を含むがこれらに限定されない)。

【0069】

本明細書中で用いられる場合、用語「癌」(用語「過剰増殖性」および「新生物性」とも交換可能に用いられる)とは、自律増殖する能力を有する(すなわち、迅速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる、異常な状況または状態の)細胞をいう。癌性疾患状態は

50

、病的（すなわち、疾患状態を特徴付けるかまたは構成する；例えば、悪性腫瘍増殖）と分類され得るか、または非病的（すなわち、正常状態からは逸脱しているが、疾患状態とは関連していない；例えば、創傷修復に関連した細胞増殖）と分類され得る。この用語は、組織病理学的型または侵襲性の段階にかかわらず、全ての型の癌性増殖または発癌プロセス、転移性組織または悪性形質転換細胞、悪性形質転換組織もしくは悪性形質転換器官を包含することが意味される。用語「癌」は、種々の器官系の悪性疾患（例えば、肺、胸部、甲状腺、リンパ管、胃腸管、および尿生殖管に罹患する悪性疾患）、ならびに腺癌（これは、大部分の結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌および／または精巣腫瘍のような悪性疾患を包含する）、肺の非小細胞癌、小腸癌および食道癌を包含する。用語「癌腫」は、当該分野で認識されており、そして上皮組織または内分泌組織の悪性疾患（呼吸器系癌腫、胃腸系癌腫、泌尿生殖器系癌腫、精巣癌腫、胸部癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、および黒色腫を包含する）をいう。例示的な癌腫としては、子宮頸部、肺、前立腺、胸部、頭部および頸部、結腸ならびに卵巣の組織から形成される癌腫が挙げられる。用語「癌腫」はまた、癌肉腫を包含し、例えば、これは、癌性でかつ肉腫性の組織から構成される悪性腫瘍を包含する。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫をいう。用語「肉腫」は、当該分野で認識されており、間葉誘導物である悪性腫瘍をいう。

【0070】

本発明の69583分子または85924分子を用いて、種々の増殖性障害をモニタリング、処置および／または診断し得る。このような障害としては、造血新生物障害が挙げられる。本明細書中で用いられる場合、用語「造血新生物障害」としては、（例えば、骨髓系統、リンパ系統もしくは赤血球系統またはそれらの前駆細胞から生じる）造血起源の過形成細胞／新生物細胞を含む疾患が挙げられる。好ましくは、この疾患は、ほとんど分化していない急性白血病（例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病）から生じる。さらなる例示的な骨髓障害としては、急性前骨髓球白血病（APML）、急性骨髓性白血病（AML）および慢性骨髓性白血病（CML）（V a i c k u s (1991) C r i t R e v . i n O n c o l . / H e m o t o l . 11:267-97において概説される）が挙げられるがこれらに限定されない；リンパ性悪性疾患としては、急性リンパ芽球性白血病（ALL）（これは、B系統ALLおよびT系統ALLを包含する）、慢性リンパ性白血病（CLL）、前リンパ球性白血病（PLL）、毛様細胞性白血病（HLL）およびヴァルデンストレームマクログロブリン血症（WM）が挙げられるがこれらに限定されない。さらなる形態の悪性リンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫およびその変種、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）、皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）、大型顆粒リンパ球白血病（LGF）、ホジキン病およびリードースターンバーグ疾患が挙げられるがこれらに限定されない。

【0071】

69583タンパク質または85924タンパク質、そのフラグメント、および誘導体、ならびにその配列番号2または配列番号5における配列の他の改変体は、総称して、「本発明のポリペプチドまたはタンパク質」あるいは「69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドあるいは69583タンパク質または85924タンパク質」という。こ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は、総称して、「本発明の核酸」または「69583核酸または85924核酸」という。

【0072】

本明細書中で使用する場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびに例えば、ヌクレオチドアナログの使用によって生成される、DNAまたはRNAのアナログを含む。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは、二本鎖DNAである。

【0073】

用語「単離された核酸分子または精製された核酸分子」は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を含む。例えば、ゲノムDNAに関して、用語「

単離された」は、そのゲノムDNAが天然で結合している染色体から分離された核酸分子を含む。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸が由来する生物のゲノムDNAにおいて、その核酸に天然で隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および／または3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて、天然でその核酸分子に隣接する、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満の5'側および／または3'側のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、cDNA分子）は、実質的に、他の細胞物質、または、組換え技術により生成される場合、培養培地を含まないか、あるいは、化学合成される場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。

10

【0074】

本明細書中で使用される場合、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする」とは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を説明する。ハイブリダイゼーション反応を実施するための手引きは、Current Protocols in Molecular Biology (1989) John Wiley & Sons, N. Y., 6.3.1-6.3.6（これは、本明細書中で参考として援用される）において見出され得る。水性および非水性の方法は、その参考文献に記載され、そしてそのいずれかが使用され得る。本明細書中で言及される特定のハイブリダイゼーション条件は、以下の通りである：1) 約45℃で6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）中での低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の少なくとも50℃で0.2×SSC、0.1% SDS中での2回の洗浄（洗浄温度は、低ストリンジェンシーの条件について55℃まで上昇され得る）；2) 約45℃で6×SSC中での中程度にストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の60℃で0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄；3) 約45℃で6×SSC中での高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件、その後の65℃で0.2×SSC、0.1% SDS中での1回以上の洗浄；そして好ましくは、4) 非常に高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、65℃で0.5Mリン酸ナトリウム、7% SDS、その後の65℃で0.2×SSC、1% SDS中での1回以上の洗浄である。非常に高ストリンジェンシー条件（4）が、好ましい条件であり、そして他にそうでないことが示されない限り、使用されるべき条件である。

20

30

【0075】

本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子は、天然で生じる（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有するRNA分子またはDNA分子をいう。

【0076】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、69583タンパク質または85924タンパク質、好ましくは、哺乳動物69583タンパク質または85924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をいい、そして非コード調節配列およびイントロンをさらに含み得る。

40

【0077】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質は、そのタンパク質が由来する細胞または組織供給源由来の細胞物質または他の混入タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成された場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。1つの実施形態において、語「実質的に含まない」は、69583タンパク質または85924タンパク質の調製物が、約30%、20%、10%、およびより好ましくは、5%未満（乾燥重量）の、非69583タンパク質または非85924タンパク質（本明細書中で「混入タンパク質」とも呼ばれる）または化学前駆体もしくは非69583化学物質または非85924化学物質を有することを意味する。69583タンパク質または85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、それ

50

はまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まない（すなわち、培養培地は、タンパク質調節物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を占める）。本発明は、乾燥重量で、少なくとも0.01、0.1、1.0、および10mgの単離または精製された調製物を含む。

【0078】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を喪失すること、またより好ましくは実質的に変更することなく、69583または85924の野生型配列（例えば、配列番号1、3、4または6の配列）から変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、そのような変化を生じる。例えば、本発明のポリペプチドにおいて保存されたアミノ酸残基（例えば、プロテインキナーゼドメインまたはSH3ドメイン中に存在するアミノ酸残基）は、変更に対して特に影響を受けにくいことが予想される。

10

【0079】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、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）、非荷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、スレオニン、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、バリン、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）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、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）が挙げられる。従って、69583タンパク質または85924タンパク質中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同一側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、69583または85924のコード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入され得（例えば、飽和変異誘発によって）、そして得られる変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、69583または85924の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6の変異誘発の後、コードされるタンパク質は、組換え発現され得、そしてタンパク質の活性が、決定され得る。

20

30

【0080】

本明細書中で使用される場合、69583タンパク質または85924タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、69583分子または85924分子と非69583分子または非85924分子との間の相互作用に参与する、69583タンパク質または85924タンパク質のフラグメントを包含する。69583タンパク質または85924タンパク質の生物学的に活性な部分としては、全長69583タンパク質または全長85924タンパク質より少ないアミノ酸を含みかつ69583タンパク質または85924タンパク質の少なくとも1つの活性を示す、69583タンパク質または85924タンパク質のアミノ酸配列に十分に相同であるかまたはそれに由来するアミノ酸配列（例えば、配列番号2または配列番号5に示されるアミノ酸配列）を含むペプチドが挙げられる。代表的には、生物学的に活性な部分は、69583タンパク質または85924タンパク質の少なくとも1つの活性（例えば、ATP結合、ならびに細胞増殖および細胞分裂に関連する生化学的変化および形態学的変化の調節）を有するドメインまたはモチーフを含む。69583タンパク質または85924タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10アミノ酸長、25アミノ酸長、50アミノ酸長、100アミノ酸長、200アミノ酸長以上であるポリペプチドであり得る。69583タンパク質または85924タンパク質の生物学的に活性な部分は、69583媒介性活性または85924媒介性活性（例えば、ATP結合、ならびに細胞増殖および細胞分裂に関連する生化学的変化および形態学的変化の調節）を調節する薬剤を開発するための標的として使用され得る。

40

【0081】

50

配列間の相同性または配列同一性（用語「相同性」および「同一性」は、本明細書中で交換可能に使用される）の計算は、以下のように実施される。

【0082】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップが、最適な整列のために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列は、比較目的で無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の少なくとも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%、さらにより好ましくは60%、およびさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%の長さである（例えば、1037アミノ酸残基を有する、配列番号2の69583アミノ酸配列に第2の配列を整列する場合、少なくとも311アミノ酸残基、好ましくは少なくとも415アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも518アミノ酸残基、なおより好ましくは少なくとも622アミノ酸残基、そしてさらにより好ましくは少なくとも725アミノ酸残基、830アミノ酸残基または933アミノ酸残基が整列される；2194アミノ酸残基を有する、配列番号5の85924アミノ酸配列に第2の配列を整列する場合、少なくとも658アミノ酸残基、好ましくは少なくとも878アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも1097アミノ酸残基、なおより好ましくは少なくとも1316アミノ酸残基、そしてさらにより好ましくは少なくとも1536アミノ酸残基、1755アミノ酸残基、または1975アミノ酸残基が整列される）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第1の配列における位置が、第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、これらの分子は、その位置で同一である（本明細書中で使用される場合、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」と等しい）。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である（2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要のある、ギャップの数および各ギャップの長さが考慮される）。

10

20

【0083】

配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージにおいてGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（（1970）J. Mol. Biol. 48:444-453）のアルゴリズムを用い、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4およびレンクスウェイト（length weight）1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用い、NW Sgapdna. CMPマトリクスならびにギャップウェイト40、50、60、70、または80およびレンクスウェイト1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。特に好ましいパラメータセット（および分子が本発明の配列同一性または配列相同性の限界内にあるか否かを決定するためにどのパラメータが適用されるべきかについて実施者の気持ちが決まっていない場合に使用されるべきパラメータセット）は、Blossum 62スコアリングマトリクス（ギャップペナルティー12、ギャップエクステンデペナルティー4、およびフレームシフトギャップペナルティー5）である。

30

40

【0084】

2つのアミノ酸配列間またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたMeyersおよびMiller（（1989）CABIOS, 4:11-17）のアルゴリズムを用い、PAM120ウェイトレジデューテーブル（weight residue table）、ギャップレンクスペナルティー12、およびギャップペナルティー4を用いて決定され得る。

【0085】

50

本明細書中に記載される核酸配列およびタンパク質配列は、「問い合わせ配列」として使用され、公開されたデータベースに対して（例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するために）サーチが実施され得る。このようなサーチは、Altschulら（1990）J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて実施され得る。BLASTヌクレオチドサーチは、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワードレンクス＝12を用いて実施され得、本発明の69583核酸分子または85924核酸分子に対して相同なヌクレオチド配列が獲得される。BLASTタンパク質サーチは、XBLASTプログラム、スコア＝50、ワードレンクス＝3を用いて実施され得、本発明の69583タンパク質分子または85924タンパク質分子に対して相同なアミノ酸配列が獲得される。比較目的でギャップアラインメント（gapped alignment）を獲得するために、Gapped BLASTが、Altschulら（1997）Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載のように使用され得る。BLASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る。

【0086】

本発明の特定の69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列の文脈で、用語「実質的に同一」は、第1および第2のアミノ酸配列が、共通の構造的ドメインおよび／または共通の機能的活性を有し得るに十分な数または最小限の数の、i) 第2のアミノ酸配列における整列されたアミノ酸残基と同一であるかまたはii) その保存的置換であるアミノ酸残基を含む第1のアミノ酸をいうように本明細書中で使用される。例えば、配列番号2または配列番号5に対して少なくとも約60%、または65%の同一性、おそらく、75%の同一性、よりおそらくは85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する共通の構造的ドメインを含むアミノ酸配列は、実質的に同一であると言及される。

【0087】

ヌクレオチド配列の文脈において、用語「実質的に同一」は、第1および第2のヌクレオチド配列が、共通の機能的活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造的ポリペプチドドメインもしくは共通の機能的ポリペプチド活性をコードするに十分な数または最小限の数の、第2の核酸配列における整列されたヌクレオチドと同一のヌクレオチドを含む第1の核酸配列をいうよう本明細書中で使用される。例えば、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に対して少なくとも約60%、または65%の同一性、おそらく、75%の同一性、よりおそらくは85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するヌクレオチド配列は、実質的に同一であると言及される。

【0088】

「誤発現または異常な発現」は、本明細書中で使用される場合、RNAまたはタンパク質のレベルでの遺伝子発現の非野生型パターンをいう。これらとしては、以下：非野生型レベルでの発現（すなわち、過剰発現または過少発現）；遺伝子が発現される時点または段階の点で野生型と異なる発現パターン（例えば、所定の発達期または段階での増加または減少した発現（野生型と比較した場合））；所定の細胞型または組織型において減少した発現（野生型と比較した場合）の点で野生型と異なる発現パターン；発現されるポリペプチドのスプライシングサイズ、アミノ酸配列、翻訳後修飾、または生物学的活性の点で野生型と異なる発現パターン；遺伝子の発現に対する環境的刺激または細胞外刺激の効果の点で野生型と異なる発現パターン（例えば、刺激の強度における増加または減少の存在下で増加または減少した発現パターン（野生型と比較した場合））、が挙げられる。

【0089】

「被験体」は、本明細書中で使用される場合、哺乳動物（例えば、ヒト）、または実験モ

デルもしくは動物モデルもしくは疾患モデルを指し得る。この被験体はまた、非ヒト動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、または他の家畜動物）であり得る。

【0090】

「細胞の精製調製物」は、本明細書中で使用される場合、植物細胞もしくは動物細胞の場合は細胞のインビボ調製物を指し、インタクトな植物全体も動物全体も指さない。培養細胞または微生物細胞の場合、それは、被験体細胞の少なくとも10%そしてより好ましくは50%の調製物からなる。

【0091】

本発明の種々の局面は、以下でさらに詳細に記載される。

【0092】

（単離された核酸分子）

1つの局面において、本発明は、本明細書中に記載される69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチド（例えば、全長69583タンパク質または85924タンパク質またはそのフラグメント（例えば、69583タンパク質または85924タンパク質の生物学的に活性な部分））をコードする単離または精製された核酸分子を提供する。ハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに適した核酸フラグメント（これらは、例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を同定するために使用され得る）、69583 mRNAまたは85924 mRNA、およびプライマー（例えば、核酸分子の増幅または変異のためのPCRプライマー）として使用するのに適したフラグメントもまた含まれる。

【0093】

1つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1および配列番号4に示されるヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の一部を含む。1つの実施形態において、これらの核酸分子は、ヒト69583タンパク質または85924タンパク質をコードする配列（すなわち、配列番号3に示されるような、配列番号1の「コード領域」、配列番号6に示されるような、配列番号4の「コード領域」）、ならびに5'非翻訳配列（配列番号4のヌクレオチド1～66）および3'非翻訳配列（配列番号1のヌクレオチド31111～5549および配列番号4のヌクレオチド6648～7825）を含む。あるいは、これらの核酸分子は、配列番号1のコード領域（例えば、配列番号3）および配列番号4のコード領域（配列番号6）をのみを含み得、そして例えば、通常対象配列に付随する隣接配列を含まない。別の実施形態において、核酸分子は、配列番号2のアミノ酸約41～100、配列番号2のアミノ酸約124～398または配列番号5のアミノ酸約181～439のタンパク質フラグメントに対応する配列をコードする。

【0094】

別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4もしくは配列番号6に示されるヌクレオチド配列の相補鎖またはこれらのヌクレオチド配列の任意の一部分である、核酸分子を含む。他の実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に示されるヌクレオチド配列に十分相補的であり、その結果、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし得、それによって、安定な二重鎖を形成する。

【0095】

1つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に示されるヌクレオチド配列の全長に対して、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上相同なヌクレオチド配列、またはその一部（好ましくは、これらのヌクレオチド配列のいずれかの、同一の長さのもの）を含む。

【0096】

10

20

30

40

50

(69583または85924の核酸フラグメント)

本発明の核酸分子は、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6の核酸配列の一部のみを含み得る。例えば、このような核酸分子は、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメントまたは69583タンパク質または85924タンパク質の一部をコードするフラグメント(例えば、69583タンパク質または85924タンパク質の免疫原性部分または生物学的に活性な部分)を含み得る。フラグメントは、ヒト69583または85924のプロテインキナーゼドメインまたはSH3ドメインをコードする配列番号1および配列番号4のヌクレオチドを含み得る。69583遺伝子または85924遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列により、他の69583または85924のファミリーメンバーまたはそれらのフラグメント、ならびに他の種由来の69583または85924のホモログまたはそれらのフラグメントを同定および/またはクローニングするのに使用するために設計されたプローブおよびプライマーが作製され得る。

【0097】

別の実施形態において、核酸は、コード領域の一部または全てを含みかつ5'非コード領域非コード領域または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。他の実施形態は、本明細書中に記載されるアミノ酸フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本明細書中に記載される特定のドメインもしくは部位またはそれらのフラグメント(特に、少なくとも100アミノ酸長のそれらのフラグメント)をコードし得る。フラグメントはまた、上記の特定のアミノ酸配列に対応する核酸配列またはそれらのフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本発明以前に開示されたかもしれないフラグメントを包含すると解釈されるべきでない。

【0098】

核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるドメイン、領域、または機能的部位に対応する配列を含み得る。核酸フラグメントはまた、本明細書中に記載される1つ以上のドメイン、領域、または機能的部位を含み得る。従って、例えば、69583核酸フラグメントまたは85924核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるような、プロテインキナーゼドメインまたはSH3ドメインに対応する配列を含み得る。

【0099】

69583プローブまたは85924プローブおよび69583プライマーまたは85924プライマーが提供される。代表的に、プローブ/プライマーは、単離または精製されたオリゴヌクレオチドである。このオリゴヌクレオチドは、代表的に、ストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号4もしくは配列番号6のセンス配列もしくはアンチセンス配列、または配列番号1、配列番号3、配列番号4もしくは配列番号6の天然に存在する対立遺伝子改変体もしくは変異体のうちの、少なくとも約7個、12個、または15個、好ましくは約20個または25個、より好ましくは約30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個、または75個連続するヌクレオチドとハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0100】

好ましい実施形態において、その核酸は、長さが少なくとも5塩基対もしくは10塩基対であり、かつ200塩基対未満、より好ましくは100塩基対未満、もしくは50塩基対未満である、プローブである。その核酸は、本明細書中に開示される配列と同一であるか、または1塩基または5塩基未満もしくは10塩基未満異なるべきである。この比較のために整列が必要な場合、それらの配列は、最大相同性のために整列されるべきである。欠失もしくは挿入から生じる「ループアウト配列」またはミスマッチは、差異と見なされる。

【0101】

プローブまたはプライマーは、以下をコードする核酸のセンス鎖またはアンチセンス鎖に由来し得る：

配列番号2のアミノ酸残基約124～398または配列番号5のアミノ酸残基約181～439のプロテインキナーゼドメイン；あるいは配列番号2のアミノ酸残基約41～100のSH3ドメイン。

【0102】

別の実施形態において、69583配列または85924配列の選択された領域（例えば、本明細書中に記載されるドメイン、領域、部位、または他の配列）を増幅するために使用され得るプライマーのセット（例えば、PCRにおいて使用するのに適切なプライマー）が、提供される。そのプライマーは、長さが少なくとも5塩基対、10塩基対、もしくは50塩基対であり、かつ100塩基対未満もしくは200塩基対未満であるべきである。そのプライマーは、本明細書中に開示される配列または天然に存在する改変体と、同一であるかまたは1塩基異なるべきである。例えば、以下の領域のうちのいずれかのすべてまたは一部を増幅するために適切なプライマーが、提供される：配列番号2のアミノ酸残基約124～398または配列番号5のアミノ酸残基約181～439のプロテインキナーゼドメイン；および配列番号2のアミノ酸残基約41～100のSH3ドメイン。 10

【0103】

核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるポリペプチドのエピトープ保有領域をコードし得る。

【0104】

「69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6のヌクレオチド配列の一部を単離すること（このヌクレオチド配列は、69583または85924の生物学的活性を有するポリペプチドをコードする（例えば、69583タンパク質または85924タンパク質の生物学的活性が、本明細書中に記載されている））、69583タンパク質または85924タンパク質のコード部分を（例えば、インビトロにおける組換え発現によって）発現すること、および69583タンパク質または85924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、調製され得る。例えば、69583タンパク質または85924の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、例えば、配列番号2のアミノ酸残基約124～398または配列番号5のアミノ酸残基約181～439のプロテインキナーゼドメイン；および配列番号2のアミノ酸残基約41～100のSH3ドメインを含む。69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドの生物学的に活性な活性部分をコードする核酸フラグメントは、300ヌクレオチド以上の長さを超えるヌクレオチド配列を含み得る。 20 30

【0105】

好ましい実施形態において、核酸は、約300ヌクレオチド長、400ヌクレオチド長、500ヌクレオチド長、600ヌクレオチド長、700ヌクレオチド長、800ヌクレオチド長、900ヌクレオチド長、1000ヌクレオチド長、1100ヌクレオチド長、1200ヌクレオチド長、1300ヌクレオチド長、1400ヌクレオチド長、1500ヌクレオチド長、1600ヌクレオチド長、1700ヌクレオチド長、1800ヌクレオチド長、1900ヌクレオチド長、2000ヌクレオチド長、2100ヌクレオチド長、2200ヌクレオチド長、2300ヌクレオチド長、2400ヌクレオチド長、2500ヌクレオチド長、2600ヌクレオチド長、2700ヌクレオチド長、2800ヌクレオチド長、2900ヌクレオチド長、3000ヌクレオチド長、3100ヌクレオチド長、3200ヌクレオチド長、3300ヌクレオチド長、3400ヌクレオチド長、3500ヌクレオチド長、3600ヌクレオチド長、3700ヌクレオチド長、3800ヌクレオチド長、3900ヌクレオチド長、4000ヌクレオチド長、4100ヌクレオチド長、4120ヌクレオチド長、4140ヌクレオチド長、4160ヌクレオチド長、4180ヌクレオチド長、4200ヌクレオチド長、4300ヌクレオチド長、4400ヌクレオチド長、4500ヌクレオチド長、4600ヌクレオチド長、4700ヌクレオチド長、4800ヌクレオチド長、4900ヌクレオチド長、5000ヌクレオチド長、5100ヌクレオチド長、5200ヌクレオチド長、5300ヌクレオチド長、5320ヌクレオチ 40 50

ド長、5340ヌクレオチド長、5360ヌクレオチド長、5380ヌクレオチド長、5400ヌクレオチド長、5500ヌクレオチド長、5600ヌクレオチド長、5700ヌクレオチド長、5800ヌクレオチド長、5900ヌクレオチド長、6000ヌクレオチド長、6100ヌクレオチド長、6200ヌクレオチド長、6300ヌクレオチド長、6400ヌクレオチド長、6500ヌクレオチド長、6600ヌクレオチド長、6700ヌクレオチド長、6800ヌクレオチド長、6900ヌクレオチド長、7000ヌクレオチド長、7100ヌクレオチド長、7200ヌクレオチド長以上でありかつ配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6の核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含む。

【0106】

10

(69583または85924の核酸改変体)

本発明は、さらに、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6に示されるヌクレオチド配列と異なる核酸分子を含む。このような差異は、遺伝的コードの縮重に起因し得、そして本明細書中に開示されるヌクレオチド配列によってコードされるようなタンパク質と同一の69583タンパク質または85924タンパク質をコードする核酸を生じる。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号5に示されるアミノ酸残基が少なくとも1個であるが、5個未満、10個未満、20個未満、50個未満、または100個未満異なる、アミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。アライメントが、この比較に必要とされる場合、これらの配列は、最大の相同性について整列されるべきである。欠失もしくは挿入からの「ループ」アウト配列、またはミスマッチは、差異とみなされる。

20

【0107】

本発明者らの核酸は、特定の発現系に対して、好ましいコドンまたは好ましくないコドンを有するように選択され得る。例えば、核酸は、少なくとも一つのコドン、好ましくは、コドンの少なくとも10%、または20%が、E. coli細胞、酵母細胞、ヒト細胞、昆虫細胞、またはCHO細胞中での発現に対して最適化される配列のように変更された、核酸であり得る。

【0108】

核酸改変体は、天然に存在し得、例えば、対立遺伝子改変体（同一の遺伝子座）、ホモログ（異なる遺伝子座）、およびオルソログ（異なる生物）であり得るか、または天然に存在し得ない。天然に存在しない改変体は、ポリヌクレオチド、細胞、または生物に適用される技術を含む、変異誘発技術により作製され得る。この改変体は、ヌクレオチドの置換、欠失、逆位および挿入を含み得る。改変体は、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おいて生じ得る。これらの改変体は、保存的アミノ酸置換基および非保存的アミノ酸置換基（コードされた産物と比較した場合）の両方を生成し得る。

30

【0109】

好ましい実施形態において、核酸は、例えば、以下が、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6の核酸と異なる：少なくとも1個のヌクレオチドだが、10個未満、20個未満、30個未満、または40個未満のヌクレオチド；目的の核酸の少なくとも1個のヌクレオチドだが、1%未満、5%未満、10%未満または20%未満のヌクレオチド。この分析の必要性がある場合、この配列は、最大相同性でアライメントされるべきである。欠失、もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、異なるとみなされる。

40

【0110】

オルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体は、当該分野で公知の方法を使用して同定され得る。これらの改変体は、配列番号2もしくは配列番号5に示されるヌクレオチド配列またはこれらの配列のフラグメントに対して、50%、少なくとも約55%、代表的に、少なくとも約70~75%、より代表的に、少なくとも約80~85%、そして最も代表的に、少なくとも約90~95%以上同一である、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような核酸分子は、配列番号2もしくは配列番号5に示されるヌ

50

クレオチド配列またはそれらの配列のフラグメントに対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るとして、容易に同定され得る。本発明の 6 9 5 8 3 cDNA または 8 5 9 2 4 cDNA のオルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体に対応する核酸分子は、6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子と同一の染色体または遺伝子座にマッピングすることによって、さらに単離され得る。

【0111】

好ましい改変体としては、細胞増殖および細胞分裂に関連する生化学的变化および形態学的変化の調節と関連する改変体が挙げられる。

【0112】

6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 (例えば、ヒト 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4) の対立遺伝子改変体は、機能的タンパク質および非機能的タンパク質の両方を含む。機能的対立遺伝子改変体は、ATP を結合する能力を維持する、集団内の 6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。機能的対立遺伝子改変体は、代表的に、配列番号 2 もしくは配列番号 5 の 1 つ以上のアミノ酸の保存的置換のみを含むか、またはタンパク質の非必須領域における非必須残基の置換、欠失もしくは挿入を含む。非機能的対立遺伝子改変体は、ATP を結合する能力を有さない、集団内の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 (例えば、ヒト 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4) のタンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。非機能的対立遺伝子改変体は、代表的には、配列番号 2 もしくは配列番号 5 のアミノ酸配列の非保存的置換、欠失もしくは挿入、または未成熟切断、あるいはこのタンパク質の必須残基または必須領域における置換、挿入もしくは欠失を含む。

【0113】

さらに、他の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 ファミリーメンバーをコードする核酸分子 (従って、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 4 または配列番号 6 の 6 9 5 8 3 配列または 8 5 9 2 4 配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子) は、本発明の範囲内であることが意図される。

【0114】

(アンチセンス核酸分子、リボザイムおよび改変された 6 9 5 8 3 核酸分子または 8 5 9 2 4 核酸分子)

別の局面において、本発明は、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 に対してアンチセンスである単離された核酸分子を特徴とする。「アンチセンス」核酸は、例えば、二本鎖 cDNA 分子のコード鎖に対して相補的であるか、または mRNA 配列に対して相補的である、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的である、ヌクレオチド配列を含み得る。このアンチセンス核酸は、全 6 9 5 8 3 コード鎖もしくは全 8 5 9 2 4 コード鎖、またはその一部のみ (例えば、配列番号 3 に対応するヒトヒト 6 9 5 8 3 のコード領域または配列番号 6 に対応するヒト 8 5 9 2 4 のコード領域) に対して相補的であり得る。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 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' 非翻訳領域および 3' 非翻訳領域) に対してアンチセンスである。

【0115】

6 9 5 8 3 mRNA または 8 5 9 2 4 mRNA の全コード領域に対して相補的であるように、アンチセンス核酸が、設計され得るが、より好ましくは、このアンチセンス核酸は、6 9 5 8 3 mRNA または 8 5 9 2 4 mRNA のコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、6 9 5 8 3 mRNA または 8 5 9 2 4 mRNA の翻訳開始部位を取り囲む領域 (例えば、目的の標的遺伝子ヌクレオチド配列の -10 と +10 との間の領域) に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 以上のヌクレオチド長であり得る。

【0116】

本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用する化学合成および酵素学的ライゲーション反応を使用して、構築され得る。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、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増加させるかもしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成された二重鎖の物理学的安定性を増加させるように設計された多様に改変されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る（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が、使用され得る）。アンチセンス核酸はまた、核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを生物学的に使用して産生され得る（すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の節でさらに記載されている、目的の標的核酸に対してアンチセンス配向のRNAである）。

10

【0117】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的に、（例えば、組織部位での直接的な注入によって）被験体に投与されるか、またはこれらのアンチセンス核酸分子が、69583タンパク質または85924タンパク質をコードする細胞性mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはこれらに結合し、それによって例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害するように、インサイチュで産生される。あるいは、アンチセンス核酸分子が改変されて、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与され得る。全身投与に関して、例えば、細胞表面レセプター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連結することによって、このアンチセンス分子は、選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原に特異的にかまたは選択的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力なpol I Iプロモーターまたはpol I I Iプロモーターの制御下に置かれるベクター構築物が、好ましい。

20

【0118】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子である。 α -アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここでは、通常の β -ユニットとは対照的に、これらの鎖は互いに対して平行に走る（Gaultierら（1987）Nucleic Acids Res. 15:6625-6641）。アンチセンス核酸分子はまた、2'-O-メチルリボヌクレオチド（Inoueら（1987）Nucleic Acids Res. 15:6131-6148）またはキメラRNA-DNAアナログ（Inoueら（1987）FEBS Lett. 215:327-330）を含み得る。

30

【0119】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。69583コード核酸または85924コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示される69583 cDNAまたは85924 cDNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1、配列番号3、配列番号4または配列番号6）に対して相補的な1以上の配列、ならびにmRNAの切断を担う公知の触媒配列を有する配列を含み得る（米国特許第5,093,246号またはHaselhoffおよびGerlach（1988）Nature 334:585-591を参照のこと）。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が69583コードmRNAまたは85924コードmRNA中の切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的であるように構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、69583 mRNAまたは85924 mRNAを使用して、RNA分子のプールから特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、BartelおよびSzostak（1993）Science 261:1411-1418を参照のこと。

40

50

【0120】

69583 遺伝子発現または85924 遺伝子発現は、標的細胞中で69583 遺伝子または85924 遺伝子の転写を阻害する三重ヘリックス構造を形成するために、69583 または85924 の調節領域（例えば、69583 または85924 の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することによって阻害され得る。一般に、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6:569-84; Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; およびMaher (1992) Bioassays 14:807-15を参照のこと。三重ヘリックスの形成のために標的化され得る潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加され得る。スイッチバック分子は、5'-3'、3'-5'の交互の様式で合成され、その結果、これらは、二重鎖の一方の鎖と最初に対合し、次いで他方の鎖と対合して、プリンまたはピリミジンのいずれかのかなり大きなストレッチが、二重鎖の一方の鎖上に存在することの必要性を排除する。

【0121】

本発明はまた、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチドプライマー分子およびプローブ分子を提供する。代表的に、このような標識は、化学発光、蛍光、放射活性、または比色である。

【0122】

69583 核酸分子または85924 核酸分子を、塩基部分、糖部分またはホスフェート骨格において改変し、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースホルフェート骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る（Hyrupら (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4:5-23を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースホスフェート骨格が偽ペプチド骨格により置換され、そして4つの天然の核酸塩基（nucleobase）のみが保持されている核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいう。PNAの中性の骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にし得る。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら (1996) 前出、およびPerry-O'Keefeら (1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. 93:14670-675に記載のような、標準的固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施され得る。

【0123】

69583 核酸分子または85924 核酸分子のPNAは、治療適用および診断適用において使用され得る。例えば、PNAは、遺伝子発現の配列特異的調節（例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導すること、または複製を阻害することによる）のためのアンチセンス剤またはアンチジーン（antigene）剤として使用され得る。69583 核酸分子または85924 核酸分子のPNAはまた、（例えば、PNA特異的PCRクランピング（PNA-directed PCR clamping）による）遺伝子内の一塩基対変異の分析において、他の酵素（例えば、S1ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合の「人工制限酵素」として（Hyrupら (1996)、前出）；あるいはDNA配列決定またはハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして（Hyrupら (1996)、前出；Perry-O'Keefeら、前出）、使用され得る。

【0124】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的するため）、または細胞膜（例えば、Lettingerら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaîtreら (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）もしくは血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）を通過す

る輸送を容易にする薬剤を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションにより誘発される切断薬剤（例えば、K r o l ら（1988）B i o - T e c h n i q u e s 6 : 9 5 8 - 9 7 6 を参照のこと）、インターカレート剤（例えば、Z o n（1988）P h a r m . R e s . 5 : 5 3 9 - 5 4 9 を参照のこと）を用いて改変され得る。この目的のために、この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架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤）に結合体化され得る。

【0125】

本発明はまた、本発明の69583核酸または85924核酸に対して相補的である少なくとも一つの領域を有する、分子ビーコンオリゴヌクレオチドプライマー分子およびプローブ分子を含み、2つの相補的な領域は、一方が蛍光団、そして一方がクエンチャーを有し、その結果、この分子ビーコンは、サンプル中で本発明の69583核酸または85924核酸の存在を定量するために有用である。分子ビーコン核酸は、例えば、L i z a r d i ら、米国特許第5, 854, 033号；N a z a r e n k o ら、米国特許第5, 866, 336号、およびL i v a k ら、米国特許第5, 876, 930号に記載されている。

10

【0126】

（単離された69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチド）

別の局面において、本発明は、抗69583抗体または抗85924抗体を惹起するか、または試験する（またはより一般的には、この抗体に結合する）免疫原または抗原として使用するための、単離された69583タンパク質もしくは85924タンパク質、またはフラグメント（例えば、生物学的に活性な部分）を特徴とする。69583タンパク質または85924タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはそれらのフラグメントを、組換えDNA技術によって産生するかまたは化学的に合成し得る。

20

【0127】

本発明のポリペプチドは、複数の遺伝子の存在の結果として、選択的転写事象、選択的RNAスプライシング事象、ならびに選択的翻訳事象および翻訳後事象を惹起するポリペプチドを含む。このポリペプチドは、これにより、ポリペプチドがネイティブ細胞中で発現される場合に存在するのと実質的に同一の翻訳後修飾を生じる系（例えば、培養細胞）中で発現され得るか、またはネイティブ細胞中で存在する、翻訳後修飾（例えば、グリコシル化または切断）の変更または欠損を生じる系において発現され得る。

30

【0128】

好ましい実施形態において、69583ポリペプチドは、以下の特徴のうちの一つ以上を有する：1）ATPを結合する能力を有する；2）細胞増殖および細胞分裂に関連する生化学的変化および形態学的変化を調節する能力を有する；3）平滑筋の炎症を媒介する能力を有する；4）ぜん息性応答を媒介、開始または永続化する能力を有する；5）例えば、セリン残基、スレオニン残基および／またはチロシン残基にて、基質分子をリン酸化する能力を有する；6）リン酸化のための基質として作用する能力を有する；7）ある分子量（例えば、69583ポリペプチド（例えば、配列番号2のポリペプチド）の翻訳後修飾も、アミノ酸組成も他の物理的特徴のいかなる寄与をも好ましくは無視した、推定分子量）を有する；8）配列番号2のポリペプチドと、少なくとも60%、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは、少なくとも80%、90%または95%の全体的配列類似性を有する；9）少なくとも以下のヒト組織および細胞株において発現される（腎臓および脾臓においては高レベルで発現され、肺および卵巣腫瘍においては中程度のレベルで発現される）；10）配列番号2のアミノ酸残基約124～398と、好ましくは約70%、80%、90%または95%同一である、プロテインキナーゼドメインを有する；11）配列番号2のアミノ酸残基約41～100と、好ましくは約70%、80%、90%または95%同一である、SH3ドメインを有する；12）プロテインキナーゼATP結

40

50

合領域シグネチャーを有する；13) セリン／スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャーを有する；ならびに、14) コイルドコイルパターンを有する。

【0129】

好ましい実施形態において、85924ポリペプチドは、以下の特徴のうちの一つ以上を有する：1) ATPを結合する能力を有する；2) 細胞増殖および細胞分裂に関連する生化学的変化および形態学的変化を調節する能力を有する；3) 平滑筋の炎症を媒介する能力を有する；4) ぜん息性応答を媒介、開始または永続化する能力を有する；5) 例えば、セリン残基、スレオニン残基および／またはチロシン残基にて、基質分子をリン酸化する能力を有する；6) リン酸化のための基質として作用する能力を有する；7) ある分子量（例えば、85924ポリペプチド（例えば、配列番号5のポリペプチド）の翻訳後修飾も、アミノ酸組成も他の物理的特徴のいかなる寄与をも好ましくは無視した、推定分子量）を有する；8) 配列番号5のポリペプチドと、少なくとも60%、好ましくは、少なくとも70%、より好ましくは、少なくとも80%、90%または95%の全体的配列類似性を有する；9) 配列番号5のアミノ酸残基約181～439と、好ましくは約70%、80%、90%または95%同一である、プロテインキナーゼドメインを有する；10) セリン／スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャーを有する；11) RGD細胞結合配列を有する；ならびに、12) ロイシンジッパーパターンを有する。

10

【0130】

好ましい実施形態において、69583タンパク質もしくは85924タンパク質、またはそれらのフラグメントは、配列番号2または配列番号5の対応する配列と異なる。一つの実施形態において、少なくとも1個のアミノ酸残基異なるが、15個未満、10個未満または5個未満のアミノ酸残基だけ異なる。別の実施形態において、少なくとも1個の残基異なるが、20%未満、15%未満、10%未満、または5%未満の残基の分だけ、配列番号2または配列番号5の対応する配列と異なる。（この比較が、アライメントを必要とする場合、これらの配列は、最大相同性についてアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列は、差異とみなされる）。この差異は、好ましくは、非必須残基または保存的置換基における差異または変化である。好ましい実施形態において、この差異は、配列番号2の残基約124～398もしくは配列番号5の残基約181～439にてプロテインキナーゼドメイン内に存在せず、配列番号2の残基約41～100にてSH3ドメインメインにも存在しない。別の実施形態において、1つ以上の差異は、配列番号2の残基約124～398もしくは配列番号5の残基約181～439にてプロテインキナーゼドメイン内に存在するか、または配列番号2の残基約41～100にてSH3ドメインメインに存在する。

20

30

【0131】

他の実施形態は、アミノ酸配列中の一つ以上の変化（例えば、活性に関して必須ではないアミノ酸残基の変化）を含有するタンパク質を含む。このような69583タンパク質もしくは85924タンパク質は、配列番号2または配列番号5とは、アミノ酸配列において異なるが、なお生物学的活性を保持する。

【0132】

一つの実施形態において、このタンパク質は、配列番号2または配列番号5に対して、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%以上の相同性のアミノ酸配列を含む。

40

【0133】

69583タンパク質または69583フラグメントにおいて、少なくとも1個のアミノ酸残基であるが、15個未満、10個未満または5個未満のアミノ酸残基だけ、アミノ酸の約400～1000によって規定される領域において配列番号2の配列と異なるが、アミノ酸の約41～100によって規定される領域またはアミノ酸の約124～398によって規定される領域において、配列番号2と異ならない、69583タンパク質または69583フラグメントが、提供される。85924タンパク質または85924フラグメントにおいて、少なくとも1個のアミノ酸残基であるが、15個未満、10個未満または

50

5 個未満のアミノ酸残基だけ、アミノ酸の約 1 ～ 175 もしくは 450 ～ 2190 によって規定される領域において配列番号 5 の配列と異なるが、アミノ酸の約 181 ～ 439 によって規定される領域において、配列番号 5 と異ならない、85924 タンパク質または 85924 フラグメントが、提供される。（この比較が、アライメントを必要とする場合、これらの配列は、最大相同性についてアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列が、差異とみなされる）。いくつかの実施形態において、この差異は、非必須残基にあるか、または保存的置換である一方で、この差異は、必須残基にあるか、または非保存的置換である。

【0134】

一つの実施形態において、69583 タンパク質または 85924 タンパク質の生物学的に活性な部分は、プロテインキナーゼドメインおよび／または SH3 ドメインを含む。さらに、他の生物学的に活性な部分（ここで、タンパク質の他の領域は、欠失される）は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブの 69583 タンパク質または 85924 タンパク質の機能的な活性の 1 以上について評価され得る。

【0135】

好ましい実施形態において、69583 タンパク質または 85924 タンパク質は、配列番号 2 または配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、69583 タンパク質または 85924 タンパク質は、配列番号 2 または配列番号 5 と十分に同一であるかまたは実質的に同一である。なお別の実施形態において、69583 タンパク質または 85924 タンパク質は、上記の節で詳細に記載したように、配列番号 2 または配列番号 5 と十分に同一であるかまたは実質的に同一であり、かつ配列番号 2 または配列番号 5 のタンパク質の機能的な活性を保持する。

【0136】

（69583 または 85924 のキメラタンパク質または融合タンパク質）
別の局面において、本発明は、69583 または 85924 のキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、69583 または 85924 の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非 69583 ポリペプチドまたは非 85924 ポリペプチドに連結した 69583 ポリペプチドまたは 85924 ポリペプチドを含む。「非 69583 ポリペプチドまたは非 85924 ポリペプチド」は、69583 タンパク質または 85924 タンパク質と実質的に相同的でないタンパク質（例えば、69583 タンパク質または 85924 タンパク質と異なるタンパク質および同一の生物または異なる生物由来のタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。融合タンパク質の 69583 ポリペプチドまたは 85924 ポリペプチドは、69583 アミノ酸配列または 85924 アミノ酸配列の全てまたは一部（例えば、本明細書中に記載のフラグメント）に対応し得る。好ましい実施形態において、69583 融合タンパク質または 85924 融合タンパク質は、69583 タンパク質または 85924 タンパク質の少なくとも 1 個（または 2 個）の生物学的に活性な部分を含む。非 69583 ポリペプチドまたは非 85924 ポリペプチドは、69583 ポリペプチドまたは 85924 ポリペプチドの N 末端または C 末端に融合され得る。

【0137】

この融合タンパク質は、リガンドに対して高度の親和性を有する部分を含み得る。例えば、この融合タンパク質は、69583 配列または 85924 配列が GST 配列の C 末端に対して融合される、GST-69583 融合タンパク質または GST-85924 融合タンパク質であり得る。このような融合タンパク質は、組換え 69583 または組換え 85924 の精製を容易にし得る。あるいは、この融合タンパク質は、その N 末端において、異種シグナル配列を含む 69583 タンパク質または 85924 タンパク質であり得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物の宿主細胞）において、69583 または 85924 の発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増強され得る。

【0138】

融合タンパク質は、血清タンパク質（例えば、免疫グロブリン（例えば、IgG、IgA

または I g E) の一部、例えば、免疫グロブリンまたはヒト血清アルブミンの F c 領域ならびに／もしくはヒンジ C 1 配列およびヒンジ C 2 配列) の全てまたは一部を含み得る。

【0139】

本発明の 6 9 5 8 3 融合タンパク質または 8 5 9 2 4 融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込まれ得、そしてインビボで被験体に投与され得る。6 9 5 8 3 融合タンパク質または 8 5 9 2 4 融合タンパク質は、6 9 5 8 3 基質または 8 5 9 2 4 基質のバイオアベイラビリティに影響を与えるために使用され得る。6 9 5 8 3 融合タンパク質または 8 5 9 2 4 融合タンパク質は、例えば、以下の (i)、(ii) および (iii) によって生じる障害の処置のために治療学的に有用であり得る：(i) 6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異；(ii) 6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子の誤調節；および (iii) 6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の異常な翻訳後修飾。

【0140】

さらに、本発明の 6 9 5 8 3 融合タンパク質または 8 5 9 2 4 融合タンパク質は、被験体において抗 6 9 5 8 3 抗体または抗 8 5 9 2 4 抗体を産生するための免疫原として、6 9 5 8 3 リガンドまたは 8 5 9 2 4 リガンドを精製するため、および 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 と 6 9 5 8 3 基質または 8 5 9 2 4 基質との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

【0141】

融合部分（例えば、GST ポリペプチド）をすでにコードする発現ベクターが、市販されている。6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 をコードする核酸は、このような発現ベクター中にクローニングされ得、その結果、融合部分が 6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質にインフレームで連結される。

【0142】

(6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の改変体)

別の局面において、本発明はまた、6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドの改変体（例えば、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストとして機能する）を特徴とする。6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、不連続な点変異）、配列の挿入もしくは欠失、あるいは 6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の短縮 (truncation) によって作製され得る。6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質のアゴニストは、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同一の活性またはサブセットを残存し得る。6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質のアンタゴニストは、例えば、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の 6 9 5 8 3 媒介活性または 8 5 9 2 4 媒介活性を競合的に調節することによって、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の天然に存在する形態の活性の 1 つ以上を阻害し得る。よって、特定の生物学的効果は、限定された機能の改変体を用いる処置によって誘導され得る。好ましくは、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の天然に存在する形態での処置と比較して被験体においてわずかな副作用を有する。

【0143】

6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の改変体は、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の変異体（例えば、短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。

【0144】

6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質をコードする配列のフラグメント（例えば、N 末端フラグメント、C 末端フラグメントまたは内部フラグメント）のライブラリーを使用して、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質の改変体のスクリーニング、続く選択のための多彩なフラグメント集団を作製し得る。

10

20

30

40

50

【0145】

システイン残基が付加または欠失されている改変体、あるいはグリコシル化されている残基が付加または欠失されている改変体が、特に好ましい。

【0146】

点変異または短縮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方法、および選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするための方法が、当該分野において公知である。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を高める新たな技術である機能的集合変異誘発 (recursive ensemble mutagenesis) (REM) をスクリーニングアッセイと組み合わせて使用して、69583改変体または85924改変体を同定し得る (ArklinおよびYourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89:7811-7815; Delgraveら (1993) Protein Engineering 6:327-331)。

【0147】

多彩な69583ライブラリーまたは85924ライブラリーを分析するために、細胞ベースのアッセイが利用され得る。例えば、発現ベクターのライブラリーが、細胞株 (例えば、通常、基質依存的様式で69583または85924に応答する細胞株) にトランスフェクトされ得る。次いで、トランスフェクトされた細胞は、69583または85924と接触させられ、そして69583基質または85924基質によるシグナル伝達に対する変異体発現の効果が、例えば、ATPの結合を測定することによって、検出され得る。次いで、プラスミドDNAは、69583基質または85924基質によるシグナル伝達の阻害、または代わりに増強を記録する細胞から回収され得、そして個々のクローンがさらに特徴付けられ得る。

【0148】

別の局面において、本発明は、69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチド (例えば、非野生型活性を有するペプチド、例えば、天然に存在する69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドのアнтаゴニスト、アゴニストもしくはスーパーアゴニスト、例えば、天然に存在する69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチド) を作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドの配列を変更する工程 (例えば、本明細書中に開示される非保存領域、ドメインまたは残基の1つ以上の残基の置換または欠失によって配列を変更する工程)；および所望の活性について変更されたポリペプチドを試験する工程。

【0149】

別の局面において、本発明は、天然に存在する69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドの生物学的活性を有する69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドのフラグメントまたはアナログを作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：例えば、1つ以上の残基の置換または欠失によって69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドの配列を変更する工程 (例えば、本明細書中に記載される非保存領域の配列またはドメインもしくは残基を変更する工程)；および、所望の活性について変更されたポリペプチドを試験する工程。

【0150】

(抗69583抗体または抗85924抗体)

別の局面において、本発明は、抗69583抗体または抗85924抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性な部分 (すなわち、抗原結合部分) をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、scFVフラグメントおよびdcFVフラグメント、FabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメントが挙げられ、これらは、抗体を酵素 (それぞれ、例えば、パパインまたはペプシン) で処理することにより生成され得る。

【0151】

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 (例えば、キメラ抗体ま

10

20

30

40

50

たはヒト化抗体)、完全ヒト抗体、非ヒト抗体(例えば、マウス抗体)または、単鎖抗体であり得る。好ましい実施形態において、抗体はエフェクター機能を有し、そして補体を固定し得る。抗体は、毒素または画像化剤に結合され得る。

【0152】

全長69583タンパク質もしくは全長85924タンパク質、または69583もしくは85924の抗原性ペプチドフラグメントは、免疫原として使用され得るか、あるいは他の免疫原(例えば、細胞、膜調製物など)を用いて作製された抗69583抗体または抗85924抗体を同定するために使用され得る。69583または85924の抗原性ペプチドは、配列番号2または配列番号5に示されるアミノ酸配列のうち少なくとも8個のアミノ酸残基を含むべきであり、そして69583または85924のエピトープを含む。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15個のアミノ酸残基、なおより好ましくは少なくとも20個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも30個のアミノ酸残基を含む。

10

【0153】

配列番号2のアミノ酸約50~61、約220~231、約292~302、約380~390、約410~422、約432~445、約452~470、約490~511、約531~545、約561~571、約580~591、約601~611、約641~651、約653~661、約675~691、約751~761、約765~775、約882~901、および約1002~1012由来の残基を含む69583のフラグメントは、69583タンパク質の親水性領域(図1を参照のこと)に対する抗体を作製するために使用され得る(例えば、免疫原として使用されるかまたは抗体の特異性を特徴付けるために使用される)。同様に、配列番号2のアミノ酸約329~337、約345~355、約391~400、約723~738、および約902~920由来の残基を含む69583のフラグメントは、69583タンパク質の疎水性領域に対する抗体を作製するために使用され得る;配列番号2の残基約41~50、約51~60、約61~70、約71~80、約81~90、または約91~100を含む69583のフラグメントは、69583タンパク質のSH3ドメインに対する抗体を作製するために使用され得る;配列番号2の残基約124~135、136~147、148~159、160~171、172~183、184~195、196~207、208~219、220~231、232~243、244~255、256~267、268~279、280~291、292~303、304~315、316~327、328~339、340~351、352~363、364~375、376~387、または約388~398を含む69583のフラグメントは、69583タンパク質のプロテインキナーゼドメインに対する抗体を作製するために使用され得る。

20

30

【0154】

配列番号5のアミノ酸約18~31、約151~171、約211~231、約465~481、約540~551、約570~582、約861~875、約1051~1065、約1101~1121、約1200~1218、約1280~1300、約1411~1425、約1591~1601、約1620~1640、約1661~1671、約1740~1755、約1812~1840、約1880~1891、約1911~1921、約1970~1990、約2040~2052、約2080~2091、および約2170~2180由来の残基を含む85924のフラグメントは、85924タンパク質の親水性領域(図2を参照のこと)に対する抗体を作製するために使用され得る(例えば、免疫原として使用されるかまたは抗体の特異性を特徴付けるために使用される)。同様に、配列番号5のアミノ酸約361~371、約721~732、約761~771、約821~841、約970~982、約1375~1390、約1431~1445、および約2124~2134由来の残基を含む85924のフラグメントは、85924タンパク質の疎水性領域に対する抗体を作製するために使用され得る;配列番号5の残基約181~194、195~207、208~221、222~234、235~247、248~260、261~274、275~287、288~302、303~315

40

50

、316～328、329～341、342～354、355～368、369～382、383～396、397～410、411～424、または約425～439を含む85924のフラグメントは、85924タンパク質のプロテインキナーゼドメインに対する抗体を作製するために使用され得る。

【0155】

これらの領域のいずれかまたは本明細書中に記載される他の領域もしくはドメインと反応性、または特異的もしくは選択的な抗体が提供される。

【0156】

抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、タンパク質の表面上に位置する69583または85924の領域（例えば、親水性領域）、および高い抗原性を有する領域である。例えば、ヒト69583タンパク質配列またはヒト85924タンパク質配列のE m i n i 表面確率解析を使用して、69583タンパク質または85924タンパク質の表面に局在化される確率の特に高い領域、従って、抗体産生を標的化するのに有用な表面残基を構築する可能性のある領域を示し得る。

【0157】

好ましい実施形態において、抗体は、本明細書中に記載される69583タンパク質または85924タンパク質上の任意のドメインまたは領域上のエピトープに結合する。

【0158】

さらに、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全ヒトの抗体もまた、本発明の範囲内である。キメラ抗体、ヒト抗体、しかし最も好ましくは完全ヒト抗体は、繰り返し投与を含む適用（例えば、ヒト患者の治療的処置、およびいくつかの診断的適用）に望ましい。

【0159】

キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体（ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む）は、標準的な組換えDNA技術を使用して作製され得る。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、以下に記載される方法を使用して、当該分野で公知の組換えDNA技術により産生され得る（Robinsonら、国際特許出願PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願184,187；Taniguchi, 欧州特許出願171,496；Morrisonら、欧州特許出願173,494；Neubergerら、PCT国際公開WO86/01533；Cabilllyら、米国特許第4,816,567号；Cabilllyら、欧州特許出願125,023；Betterら（1988）Science 240:1041-1043）；Liuら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443；Liuら、（1987）J. Immunol. 139:3521-3526；Sunら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218；Nishimuraら（1987）, Canc. Res. 47:999-1005；Woodら（1985）Nature 314:446-449；ならびにShawら（1988）, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559）。

【0160】

ヒト化抗体または相補性決定領域（CDR）グラフト化抗体は、ドナーCDRと置換された少なくとも1つまたは2つ（しかし、一般に3つ全て）のレシピエント（重鎖免疫グロブリン鎖および／または軽鎖免疫グロブリン鎖の）CDRを有する。抗体は、非ヒトCDRの少なくとも一部と置換され得るか、またはCDRの一部のみが、非ヒトCDRで置換され得る。69583もしくは85924またはそのフラグメントに対するヒト化抗体の結合に必要とされる数のCDRを置換することだけが必要である。好ましくは、ドナーは、げっ歯類抗体（例えば、ラット抗体またはマウス抗体）であり、そしてレシピエントは、ヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークである。代表的に、CDRを提供する免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、そしてフレームワークを提供する免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。1つの実施形態において、ドナー免疫グロブリンは、非ヒト（例えば、げっ歯類）である。アクセプターフレームワークは、天然

に存在する（例えば、ヒト）フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、あるいはこれらに約 85% 以上、好ましくは、90%、95%、99% 以上同一である配列である。

【0161】

本明細書中で使用される場合、用語「コンセンサス配列」とは、あるファミリーの関連する配列において最も頻繁に生じるアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列をいう（例えば、Winnaker, (1987) From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany を参照のこと）。あるファミリーのタンパク質において、コンセンサス配列中の各位置が、そのファミリー中のその位置で最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が同等に頻繁に生じる場合、いずれもコンセンサス配列中に含まれ得る。「コンセンサスフレームワーク」とは、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域をいう。 10

【0162】

抗体は、当該分野において公知の方法によってヒト化され得る。ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しない Fv 可変領域の配列をヒト Fv 可変領域からの等価な配列で置換することによって生成され得る。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法は、Morrisson (1985) Science 229:1202-1207、Oira, (1986) Bio Techniques 4:214、ならびに Queenら、米国特許第 5, 585, 089 号、同第 5, 693, 761 号および同第 5, 693, 762 号（これらの全ての 20 内容が、本明細書中に参考として援用される）によって提供される。これらの方法は、重鎖または軽鎖のうちの少なくとも 1 つからの免疫グロブリン Fv 可変領域の全てまたは一部をコードする核酸配列を単離する工程、操作する工程、および発現する工程を包含する。このような核酸の供給源は、当業者に周知であり、例えば、69583 ポリペプチドもしくは 85924 ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する抗体を産生するハイブリドーマより取得され得る。次いで、ヒト化抗体をコードする組換え DNA またはそのフラグメントは、適切な発現ベクター中にクローニングされ得る。

【0163】

ヒト化抗体または CDR 移植された抗体は、CDR 移植または CDR 置換によって産生され得、ここで、免疫グロブリン鎖の CDR のうち 1 つ、2 つまたは全てが置換され得る。 30 例えば、米国特許第 5, 225, 539 号；Jonesら (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyanら (1988) Science 239:1534；Beidlerら (1988) J. Immunol. 141:4053-4060；Winter 米国特許第 5, 225, 539 号（これら全ての内容が本明細書中に参考として明らかに援用される）を参照のこと。Winter は、本発明のヒト化抗体を調製するために使用され得る CDR 移植方法を記載する（1987 年 3 月 26 日に出願された UK 特許出願 GB 2188638 A；Winter 米国特許第 5, 225, 539 号（この内容は参考として明らかに援用される））。

【0164】

特定のアミノ酸が置換、欠失または付加されているヒト化抗体はまた、本発明の範囲内である。好ましいヒト化抗体は、例えば、抗原に対する結合を改善するようにフレームワーク領域にアミノ酸置換を有する。例えば、ヒト化抗体は、ドナーフレームワーク残基と同一のフレームワーク残基を有するか、またはレシピエントフレームワーク残基以外の別のアミノ酸と同一のフレームワーク残基を有する。このような抗体を生成するために、ヒト化免疫グロブリン鎖の選択された少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸で置換され得る。好ましい置換の位置は、CDR に隣接するアミノ酸残基または CDR と相互作用し得るアミノ酸残基を含む（例えば、米国特許第 5, 585, 089 号を参照のこと）。ドナーからアミノ酸を選択するための基準は、米国特許第 5, 585, 089 号（例えば、米国特許第 5, 585, 089 号の 12~16 欄、例えば、米国 40 特許第 5, 585, 089 号の 12~16 欄（これらの内容は、本明細書中に参考として 50

援用される)) に記載される。抗体をヒト化するための他の技術は、Padlanら、EP 5 195 96 A 1 (1992年12月23日公開) に記載される。

【0165】

完全なヒト抗体が、ヒト患者の治療的処置のために特に所望される。そのような抗体は、内因性免疫グロブリンの重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現することができないが、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、LonbergおよびHuszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13; 65~93; ならびに米国特許第5, 625, 126号; 同第5, 633, 425号; 同第5, 569, 825号; 同第5, 661, 016号; および同第5, 545, 806号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Fremont, CA) およびMedarex, Inc. (Princeton, NJ) のような会社が、上記の技術に類似する技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体を提供するために携わり得る。

10

【0166】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導された選択 (guided selection)」として言及される技術を用いて作製され得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体 (例えば、マウス抗体) が、同じエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導するために用いられる。この技術は、Jesperら、(1994) Bio/Technology 12: 899~903に記載されている。

20

【0167】

抗69583抗体または抗85924抗体は、単鎖抗体であり得る。単鎖抗体 (scFV) は、例えば、Colcherら (1999) Ann. NY Acad. Sci. 880: 263~80; およびReiter (1996) Clin. Cancer Res. 2: 245~52に記載されるように操作され得る。単鎖抗体は、二量体化または多量体化されて、同じ標的69583タンパク質または85924タンパク質の異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を作製し得る。

【0168】

好ましい実施形態において、抗体は、Fcレセプターを結合する能力が低下しているか、または、Fcレセプターを結合する能力を有さない。例えば、この抗体は、Fcレセプターへの結合を補助しない、アイソタイプまたはサブタイプ、フラグメントまたは他の変異体である (例えば、それは、変異または欠失したFcレセプター結合領域を有する)。

30

【0169】

抗体 (またはそのフラグメント) は、治療的部分 (例えば、細胞毒素、治療薬または放射性イオン) に結合体化され得る。細胞毒素または細胞傷害性因子としては、細胞に対して有害な任意の因子が挙げられる。例としては、以下が挙げられる: 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、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン (colchicin)、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、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、プロパノロール、プロマイシン、メイタンシノイド (例えば、メイタンシノール (米国特許第5, 208, 020号を参照のこと)、CC-1065 (米国特許第5, 475, 092号、同第5, 585, 499号、同第5, 846, 545号を参照のこと))、およびそれらのアナログまたはホモログ。治療薬としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 代謝拮抗物質 (例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、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、チオエパクロランブシル、CC-1065、メルファラン、カルマスチン (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、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、およびシス-ジクロロジア

40

50

ミンプラチナ（I I）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、タキソールおよびメイタンシノイド）。放射性イオンとしては、ヨウ素、イットリウム、およびプラセオジウムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を調節するために用いられ得、治療的部分は、古典的な化学療法剤に限定されるとは解釈されない。例えば、治療的部分とは、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素）；タンパク質（腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -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）；または（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の増殖因子のような）生物学的応答調節因子が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0171】

あるいは、抗体は、二次抗体に結合体化されて、米国特許第4,676,980号においてSegalにより記される抗体異種結合体を形成し得る。

【0172】

抗69583抗体または抗85924抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、標準的技術（例えば、アフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降）によって69583または85924を単離し得る。さらに、抗69583抗体または抗85924抗体を使用して、このタンパク質発現の量およびパターンを評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清において）69583タンパク質または85924タンパク質を検出し得る。抗69583抗体または抗85924抗体を診断的に使用して、臨床試験手順の一部として（例えば、所定の処置レジメンの効力を決定するために）組織中のタンパク質レベルをモニタリングし得る。検出は、抗体を検出可能な物質に結合すること（すなわち、物理的に連結すること）（すなわち、抗体標識）によって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -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挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、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ロセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして適切な放射活性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0173】

好ましい実施形態において、抗体は、精製された69583抗原または85924抗原、あるいはそのフラグメント（例えば、本明細書中に記載されるフラグメント）、膜結合抗原、組織（例えば、粗組織調製物、全細胞、好ましくは、生きた細胞、溶解された細胞、または細胞画分）で免疫することによって作製され得る。

【0174】

ネイティブの69583タンパク質または85924タンパク質のみを結合するか、変性した非ネイティブの69583タンパク質または85924タンパク質もしくはそれ以外の非ネイティブの69583タンパク質または85924タンパク質のみを結合するか、あるいはそれらの両方を結合する抗体は、本発明の範囲内である。線状または立体配座エ

10

20

30

40

50

ピトープを有する抗体は、本発明の範囲内である。立体配座エピトープは、しばしば、ネイティブ69583タンパク質または85924タンパク質に結合するが、変性69583タンパク質または85924タンパク質に結合しない抗体を同定することによって同定され得る。

【0175】

(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)

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含むベクター、好ましくは、発現ベクターを含む。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、連結されている別の核酸を輸送し得る核酸分子をいい、プラスミド、コスミドまたはウイルスベクターを含み得る。ベクターは、自律的な複製を行い得るか、または宿主DNA内に組み込み得る。ウイルスベクターとしては、例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスが挙げられる。

【0176】

ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適切な形態で69583核酸または85924核酸を含み得る。好ましくは、組換え発現ベクターは、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列を含む。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアダニル化シグナル）を含む。調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、ならびに組織特異的調節配列および／または誘導性配列を指向する配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得る。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、これにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはポリペプチド（融合タンパク質またはポリペプチドを含む）（例えば、69583タンパク質または85924タンパク質、69583タンパク質または85924タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生し得る。

【0177】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における69583タンパク質または85924タンパク質の発現のために設計され得る。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において発現され得る。適切な宿主細胞は、さらにGoeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAに議論される。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）インビトロで転写および翻訳され得る。

【0178】

原核生物におけるタンパク質発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用いて、ほとんどE. coliにて行われる。融合ベクターは、多くのアミノ酸をこのベクター中にコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。このような融合ベクターは、典型的に以下の3つの目的で働く：1) 組換えタンパク質の発現を増加させるため；2) 組換えタンパク質の溶解度を増加させるため；および3) アフィニティ精製におけるリガンドとして作用することによる、組換えタンパク質の精製における補助のため。しばしば、タンパク質分解性切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入され、融合部分からの組換えタンパク質の分離、続く融合タンパク質の精製を可能にする。このような酵素およびこれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; SmithおよびJohnson (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway

ay, NJ) (これらはそれぞれ、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、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する)が挙げられる。

【0179】

精製された融合タンパク質は、69583活性アッセイまたは85924活性アッセイ (例えば、以下に詳細に記載される直接アッセイまたは競合アッセイ) において、あるいは69583タンパク質または85924タンパク質に特異的もしくは選択的な抗体を生成するために使用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される融合タンパク質を使用して、骨髄細胞を感染し、続いてこの細胞を、照射したレシピエントに移植し得る。次いで、被験体レシピエントの病理学は、十分な時間 (例えば、6週間) が経過した後に試験される。 10

【0180】

E. coli における組換えタンパク質発現を最大化することは、その組換えタンパク質をタンパク質分解性切断する減弱した能力を有する宿主細菌中でタンパク質を発現することである (Gottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California 119-128)。別の戦略は、各アミノ酸に対する個々のコドンがE. coli 中で優先的に利用されるものであるように、発現ベクター中に挿入されるべき核酸の核酸配列を変更することである (Wadara (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的DNA合成技術によって行われ得る。 20

【0181】

69583発現ベクターまたは85924発現ベクターは、酵母発現ベクター、昆虫細胞内での発現のためのベクター (例えば、バキュロウイルス発現ベクター) または哺乳動物細胞内での発現に適切なベクターであり得る。

【0182】

哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオマ、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由来である。 30

【0183】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る (例えば、組織特異的調節エレメントが核酸の発現に使用される)。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkertら (1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター (CalameおよびEaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、T細胞レセプターの特定的プロモーター (WintotoおよびBaltimore (1989) EMBO J. 8:729-733)、および免疫グロブリン (Banerjiら (1983) Cell 33:729-740; QueenおよびBaltimore (1983) Cell 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; ByrneおよびRuddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlundら (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番号264, 166号) が挙げられる。発生的に調節されるプロモーター (例えば、マウスhoxプロモーター (KesselおよびGruss (1990) Science 249:374-379) およびα-フェトプロテインプロモーター (CampesおよびTilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546)) もまた、含まれる。 40 50

【0184】

本発明はさらに、アンチセンス方向で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。種々の細胞型におけるアンチセンスRNAの、構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指示する、アンチセンスの向きでクローニングされた核酸に対して作動可能に連結された調節配列（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）が選択され得る。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、または弱毒化されたウイルスの形態であり得る。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の調節の議論については、Weintroubら、(1986) Reviews-Trends in Genetics 1:1を参照のこと。

10

【0185】

本発明の別の局面は、本明細書中に記載された核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の69583核酸分子または85924核酸分子、あるいは69583核酸分子または85924核酸分子が宿主細胞ゲノムの特定の部位中に相同的に組換えることを可能とする配列を含む69583核酸分子または85924核酸分子）を含有する宿主細胞を提供する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいう。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変が次の世代において発生し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でなくてもよいが、なお、本明細書中で使用されるようなこの用語の範囲内に含まれる。

20

【0186】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、69583タンパク質または85924タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはCV-1起源、SV-40（COS）細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0187】

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術を介して宿主細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介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が挙げられる。

30

【0188】

本発明の宿主細胞を使用して、69583タンパク質または85924タンパク質を生成（すなわち、発現）し得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して69583タンパク質または85924タンパク質を生成するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、69583タンパク質または85924タンパク質が生成されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞（この中に、69583タンパク質または85924タンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を培養する工程を、包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞から69583タンパク質または85924タンパク質を単離する工程を包含する。

40

【0189】

別の局面において、本発明は、細胞、あるいは69583トランスジーンもしくは85924トランスジーンを含有する細胞またはそれ以外に69583もしくは85924を誤って発現する（misexpress）細胞からの精製調製物を特徴とする。この細胞調製物は、ヒト細胞または非ヒト細胞（例えば、げっ歯類細胞（例えば、マウス細胞もしくはラット細胞）、ウサギ細胞、またはブタ細胞）からなり得る。好ましい実施形態において、細胞は、69583トランスジーンまたは85924トランスジーン（例えば、69583または85924の異種形態、例えば、（非ヒト細胞の場合には）ヒト由来の遺伝

50

子)を、含有する。この69583トランスジーンまたは85924トランスジーンは、誤って発現(例えば、過剰発現または寡少発現(underexpress))され得る。他の好ましい実施形態において、細胞は、内在性69583または85924を誤って発現する遺伝子(例えば、遺伝子発現が損なわれる遺伝子(例えば、ノックアウト))を含有する。このような細胞は、変異した69583対立遺伝子または85924対立遺伝子、あるいは誤って発現された69583対立遺伝子または85924対立遺伝子に関係する障害を研究するためのモデル、あるいは薬物スクリーニングにおける使用のためのモデルとして作用し得る。

【0190】

別の局面において、本発明は、本発明の69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドをコードする核酸で形質転換されたヒト細胞(例えば、造血幹細胞)を、特徴とする。

【0191】

また、細胞、好ましくはヒト細胞(例えば、ヒト造血細胞または線維芽細胞)が提供され、この細胞中では、内因性69583または内因性85924が、正常では内因性69583遺伝子または内因性85924遺伝子の発現を制御しない調節配列の制御下にある。細胞(例えば、細胞株または微生物)中の内因性遺伝子の発現特徴は、挿入された調節エレメントが内因性69583遺伝子または内因性85924遺伝子に作動可能に連結されるように、細胞のゲノム中に異種性のDNA調節エレメントを挿入することによって改変され得る。例えば、「転写的にサイレント」(例えば、正常では発現されないか、または極低レベルでのみ発現される)内因性69583遺伝子または内因性85924遺伝子を、その細胞中で正常に発現される遺伝子産物の発現を促進し得る調節性エレメントを挿入することによって、活性化し得る。標的化相同組換えのような技術を使用して、例えば、Chapple、米国特許第5,272,071号;1991年5月16日に公開されたWO 91/06667に記載されるように、異種性DNAを挿入し得る。

【0192】

(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。このような動物は、69583タンパク質または85924タンパク質の機能および/または活性を研究するため、ならびに69583活性または85924活性の調節因子を同定および/または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、その動物の細胞の1つ以上がトランスジーンを含有する、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットもしくはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。トランスジーンとは、好ましくは、トランスジェニック動物の細胞のゲノム中に組み込まれるか、またはゲノム中に生じる、外因性DNAまたは内因性染色体DNAの再配置(例えば、欠失)である。トランスジーンは、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型もしくは組織においてコードされる遺伝子産物の発現を指令し得、他のトランスジーン(例えば、ノックアウト)は、発現を減少させる。従って、トランスジェニック動物は、内因性69583遺伝子または内因性85924遺伝子が、例えば、内因性遺伝子と、その動物の発生前にその動物の細胞(例えば、その動物の胚細胞)中に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更された動物であり得る。

【0193】

イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、トランスジーンの前駆体の発現の効率を増加させるためにトランスジーン中に含まれ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に69583タンパク質または85924タンパク質の発現を指向するために、本発明のトランスジーンに作動可能に連結され得る。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおける69583トランスジーンまたは85924トランスジーンの前駆体の存在ならびに/あるいはこの動物の組織もしくは細胞における69583 mRNAまたは85924 mRNAの発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物を使用して、

トランスジーンを保有するさらなる動物を育種し得る。さらに69583タンパク質または85924タンパク質をコードするトランスジーンを保有するトランスジェニック動物は、さらに、他のトランスジーンを有する他のトランスジェニック動物と交配され得る。

【0194】

69583タンパク質または85924タンパク質あるいは69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドは、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物において発現され得る（例えば、このタンパク質またはポリペプチドをコードする核酸が、動物のゲノム中に導入され得る）。好ましい実施形態において、この核酸を、組織特異的なプロモーター（例えば、乳汁特異的なプロモーターまたは卵特異的なプロモーター）の制御下に配置し、そして動物により産生される乳汁または卵から回収され得る。適切な動物は、マウス、ブタ、ウシ、ヤギおよびヒツジである。

10

【0195】

本発明はまた、例えば、以下に考察されるような、トランスジェニック動物由来の細胞集団を包含する。

【0196】

（使用）

本明細書中に記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、以下の方法の1以上に使用され得る：a) スクリーニングアッセイ；b) 予測医学（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験のモニタリング、および薬理遺伝学）；ならびにc) 処置方法（例えば、治療および予防）。

20

【0197】

本発明の単離された核酸分子を使用して、例えば、69583タンパク質または85924タンパク質を（例えば、遺伝子治療の適用における、宿主細胞中の組換え発現ベクターを介して）発現し得、（例えば、生物学的サンプル中の）69583 mRNAまたは85924 mRNAを検出し得るか、あるいは69583遺伝子または85924遺伝子中の遺伝子の変更を検出し得、そして以下にさらに記載されるように、69583または85924の活性を調節し得る。69583タンパク質または85924タンパク質を使用して、69583基質または85924基質あるいは69583インヒビターまたは85924インヒビターの不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害を処置し得る。さらに、69583タンパク質または85924タンパク質を使用して、天然に存在する69583または85924の基質についてスクリーニングし得、69583活性または85924活性を調節する薬物または化合物をスクリーニングし得、ならびに69583タンパク質または85924タンパク質あるいは69583野生型タンパク質または85924野生型タンパク質と比較して、減少した活性、異常な活性もしくは所望されない活性を有する、69583タンパク質形態または85924タンパク質形態の生成物の不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害（例えば、異常なまたは欠損した増殖障害および／または分化障害（例えば、癌腫肉腫、転移性障害）または造血性障害（例えば、白血病）、機能または発現）を、処置し得る。さらに、本発明の抗69583抗体または抗85924抗体を使用して、69583タンパク質または85924タンパク質を検出および単離し得、69583タンパク質または85924タンパク質のバイオアベイラビリティを調節し得、そして69583活性または85924活性を調節し得る。

30

40

【0198】

本発明の69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）能力について化合物を評価する方法を提供する。この方法は、以下を包含する：本発明の69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドと化合物とを接触させる工程；および化合物が本発明の69583ポリペプチドまたは85924ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合するか、あるいは複合体を形成する）能力を評価する工程。この方法は、インビトロ（例えば、無細胞系）でか、またはインビボ（例えば、ツーマイブリッド相互作用トラップアッセイ）で実施され得る。この方法を使用して、本発明

50

の 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドと相互作用する、天然に存在する分子を同定し得る。またこの方法を使用して、本発明の 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドの天然インヒビターまたは合成インヒビターを見出し得る。スクリーニング方法を、以下により詳細に考察する。

【0199】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質に結合するか、例えば 6 9 5 8 3 発現または 8 5 9 2 4 発現あるいは 6 9 5 8 3 活性または 8 5 9 2 4 活性に対する刺激作用もしくは阻害作用を有するか、あるいは例えば 6 9 5 8 3 基質または 8 5 9 2 4 基質の発現または活性に対する刺激作用または阻害作用を有する、調節因子、すなわち候補または試験の化合物または因子（例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともいわれる）を提供する。このように同定された化合物を使用して、治療プロトコル中で標的遺伝子産物（例えば、6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子）の活性を調節し得るか、標的遺伝子産物の生物学的機能を調節し得るか、または正常な標的遺伝子の相互作用を無効化（*destruct*）する化合物を、同定し得る。

10

【0200】

1つの実施形態において、本発明は、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質あるいは 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分の基質である、候補化合物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。別の実施形態において、本発明は、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質あるいは 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するかまたはその活性を調節する、候補化合物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。

20

【0201】

本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー方法（生物学的ライブラリー；ペプトイドライブラリー（ペプチドの機能を有するが、酵素的分解に対して耐性であるがそれでもなお生物学的に活性なままである、新規の非ペプチド骨格を有する分子のライブラリー；例えば、Zuckermannら（1994）J. Med. Chem. 37: 2678-85を参照のこと）；空間的にアドレス可能な並行の固相または溶液相ライブラリー；デコンボリューション（*deconvolution*）を必要とする合成ライブラリー法；「1ピーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー方法を含む）における任意の多くのアプローチを使用して獲得され得る。生物学的ライブラリーアプローチおよび、ペプチドライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限定され、一方、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子ライブラリーに適用可能である（Lam（1997）Anticancer Drug Des. 12: 145）。

30

【0202】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、例えば、以下において、当該分野で見出され得る：DeWittら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909-13；Erbら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-426；Zuckermannら（1994）、J. Med. Chem. 37: 2678-85；Chora（1993）Science 261: 1303；Carrellら（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059；Carrellら（1994）Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061；およびGallopら（1994）J. Med. Chem. 37: 1233-51。

40

【0203】

化合物のライブラリーは、溶液中に存在し得るか（例えば、Houghten（1992

50

) Biotechniques 13:412~421)、またはビーズ上 (Lam (1991) Nature 354:82~84)、チップ上 (Fodor (1993) Nature 364:555~556)、細菌上 (Ladner、米国特許第5,223,409号)、芽胞上 (Ladner、特許第'409号)、プラスミド上 (Cullら (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:1865~1869) またはファージ上 (Scott および Smith (1990) Science 249:386~390; Devlin (1990) Science 249:404~406; Cwirllaら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378~6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301~310; Ladner 前出) であり得る。

10

【0204】

1つの実施形態では、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここで69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物と接触させ、そして試験化合物が69583活性または85924活性を調節する能力を決定する。試験化合物が69583活性または85924活性を調節する能力の決定を、例えば、細胞の増殖および分裂に関連する生化学的変化および形態学的変化をモニタリングすることによって達成し得る。例えば、この細胞は、哺乳動物起源 (例えば、ヒト) であり得る。

【0205】

試験化合物が化合物 (例えば、69583基質または85924基質) への69583結合または85924結合を調節する能力、または69583または85924に結合する能力をまた、評価し得る。このことは、例えば、化合物 (例えば、基質) を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得、その結果、複合体中の標識された化合物 (例えば、基質) を検出することによって、化合物 (例えば、基質) の69583または85924への結合を決定し得る。あるいは、69583または85924を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、複合体中の試験化合物が69583基質または85924基質への69583結合または85924結合を調節する能力をモニタリングし得る。例えば、化合物 (例えば、69583基質または85924基質) を、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{35}S または ^3H で、直接的または間接的のいずれかで標識し得、そしてこの放射性同位体が、放射線放射の直接的な計数によってか、またはシンチレーション計数によってかで検出され得る。あるいは、化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そして適切な基質の産物への変換を定量することによって、この酵素標識を検出し得る。

20

30

【0206】

化合物 (例えば、69583基質または85924基質) が、任意の相互作用体 (interactant) の標識化を有する69583もしくは85924またはこれを有さない69583もしくは85924と相互作用する能力を、評価し得る。例えば、微小生理機能測定器 (microphysiometer) を使用して、化合物または69583もしくは85924のいずれかの標識化を有さない、69583または85924との化合物の相互作用を検出し得る。McConnellら (1992) Science 257:1906-1912。本明細書中で使用される場合、「微小生理機能測定器」 (例えば、Cytosensor) は、光でアドレス可能な電位差測定センサー (LAPS) を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する、分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と69583または85924との間の相互作用の指標として使用され得る。

40

【0207】

なお別の実施形態において、69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させ、そしてその試験化合物が69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力を評価する、無細胞アッセイを提供する。本発明のアッセイに使用するための6958

50

3タンパク質または85924タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分としては、非69583分子または非85924分子との相互作用に参与するフラグメント（例えば、高い表面存在可能性スコアを有するフラグメント）が挙げられる。

【0208】

本発明の無細胞アッセイにおいて、単離したタンパク質（例えば、69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分）の可溶性形態および／または膜結合形態を、使用し得る。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。このような可溶化剤の例としては、以下のような非イオン性界面活性剤が挙げられる：n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、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（Isotridecypoly（ethylene glycol ether）_n）、3-〔（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕-1-プロパンスルホネート（3-〔（3-cholamidopropyl）dimethylamminio〕-1-propane sulfonate）（CHAPS）、3-〔（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（3-〔（3-cholamidopropyl）dimethylamminio〕-2-hydroxy-1-propane sulfonate）（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。

【0209】

無細胞アッセイは、2つの成分が相互作用しそして結合し、従って除去および／または検出され得る複合体を形成し得る条件下かつそのために十分な時間をかけて、標的遺伝子タンパク質および試験化合物の反応混合物を調製する工程を、包含する。

【0210】

2つの分子間の相互作用をまた、例えば、蛍光エネルギー転移（FET）を使用して検出し得る（例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号；Stavrianopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと）。第1「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、その放射した蛍光エネルギーが、第2「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、次いで吸収エネルギーに起因して蛍光発光し得るように、選択される。あるいは、この「ドナー」タンパク質分子は、単に、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを利用し得る。異なる波長の光を放射する標識を選択して、その結果、「アクセプター」分子標識は、「ドナー」分子標識から識別され得る。これら標識間のエネルギー転移の効率は、分子を隔てる距離に関係するので、これら分子間の空間関係を評価し得る。分子間で結合が生じる状態では、このアッセイにおいて「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大となるはずである。FET結合事象を、当該分野で周知の標準的な蛍光検出手段を介して（例えば、蛍光測定器を用いて）、簡便に測定し得る。

【0211】

別の実施形態において、69583タンパク質または85924タンパク質が標的分子に結合する能力の決定を、リアルタイムの生体分子相互作用分析（Biomolecular Interaction Analysis）（BIA）を使用して達成し得る（例えば、SjolanderおよびUrbaniczky（1991）Anal. Chem. 63:2338~2345、ならびにSzaboら（1995）Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699~705を参照のこと）。「表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）」または「BIA」は、いずれの相互作用物も標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を検出する（例えば、BIAcore）。結合表面の質量の変化（結合事象を表す）は、表面付近の光の屈折率の変化（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象（optical phenomenon））を生じ、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る、

検出可能なシグナルを生じる。

【0212】

1つの実施形態において、標的遺伝子産物または試験基質を、固相上に係留する（anchoring）。固相上に係留した標的遺伝子産物／試験化合物の複合体を、反応終了時に検出し得る。好ましくは、標的遺伝子産物を固相表面上に係留し得、そして（係留されていない）試験化合物を、本明細書中で考察される検出可能な標識で、直接的または間接的のいずれかで標識し得る。

【0213】

69583もしくは85924、抗69583抗体もしくは抗85924抗体またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を容易にし、そしてこのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の69583タンパク質もしくは85924タンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での69583タンパク質もしくは85924タンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するのに適切な任意の容器内で達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方をマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ／69583融合タンパク質もしくは85924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は、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical、St. Louis、MO）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、これらを、試験化合物と混ぜ合わせるか、あるいは試験化合物および非吸着の標的タンパク質または69583タンパク質もしくは85924タンパク質のいずれかと混ぜ合わせ、そしてこの混合物を、複合体形成に貢献する条件下（例えば、塩およびpHに関して生理学的条件）でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスに固定し、例えば、上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ得、そして69583結合もしくは85924結合レベルまたは69583活性もしくは85924活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。

【0214】

69583タンパク質もしくは85924タンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上に固定するための他の技術としては、ビオチンとストレプトアビジンとの複合体化を使用することが挙げられる。ビオチン化された69583タンパク質もしくは85924タンパク質または標的分子を、当該分野において公知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、IL）を使用して、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し得、そしてストレプトアビジンでコーティングした96ウェルのプレート（Pierce Chemical）のウェル中に固定し得る。

【0215】

このアッセイを行うために、非固定化成分を、係留された成分を含むコーティングされた表面に添加する。反応の完了後、形成された任意の複合体が固相表面上で依然として固定化されているような条件下で、未反応成分を取り除く（例えば、洗浄によって）。固相表面上に係留された複合体の検出を、多くの方法で達成し得る。それまで固定化されない成分を予め標識する場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。それまで固定化されない成分が予め標識されない場合、間接標識を使用して、表面上に係留された複合体を検出し得る：例えば、固定化成分に特異的または選択的な標識抗体の使用（次いで、この抗体は、直接的にか、または例えば標識された抗Ig抗体で間接的に標識され得る）。

【0216】

1つの実施形態において、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または標的分子と反応性であるが、69583タンパク質もしくは85924タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体を利用して、アッセイを実施する。このような抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的または69583タンパク質もしくは85924タンパク質が、抗体の結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体に関しての上記のものに加えて、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する複合体の免疫検出、ならびに69583タンパク質もしくは85924タンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

10

【0217】

あるいは、無細胞アッセイを液相中で行い得る。このようなアッセイにおいて、以下に挙げられる任意の多くの標準的な技術によって、反応生成物を未反応成分から分離するが、これらに限定されない：差次的遠心分離（例えば、RivasおよびMinton（1993）*Trends Biochem Sci* 18:284-7を参照のこと）；クロマトグラフィー（ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー）；電気泳動（例えば、Ausubelら、編、（1999）*Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New Yorkを参照のこと）；および免疫沈降（例えば、Ausubelら、編（1999）*Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New Yorkを参照のこと）。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に公知である（例えば、Heegaard（1998）*J Mol Recognit* 11:141-8；HageおよびTweed（1997）*J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 699:499-525を参照のこと）。さらに、蛍光エネルギー転移をまた、本明細書中に記載されるように、うまく使用して、溶液からの複合体をさらに精製することなく結合を検出し得る。

20

【0218】

好ましい実施形態において、このアッセイは、69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、69583または85924を結合する公知化合物と接触させてアッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物が69583タンパク質もしくは85924タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、試験化合物が69583タンパク質もしくは85924タンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、公知化合物と比較した場合、試験化合物が、69583タンパク質もしくは85924タンパク質またはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する能力、または標的分子の活性を調節する能力を決定する工程を包含する。

30

【0219】

本発明の標的遺伝子産物は、インビボで、1つ以上の細胞性高分子または細胞外高分子（例えば、タンパク質）と相互作用し得る。この考察の目的のために、このような細胞性高分子および細胞外高分子は、本明細書中で、「結合パートナー」といわれる。このような相互作用を無効化する化合物は、標的遺伝子産物の活性を調節するのに有用であり得る。このような化合物としては、抗体、ペプチドおよび低分子のような分子が挙げられ得るが、これらに限定されない。この実施形態における使用のための好ましい標的遺伝子／産物は、本明細書中で同定された69583遺伝子または85924遺伝子である。代替の実施形態において、本発明は、試験化合物が、69583標的分子または85924標的分子の下流のエフェクターの活性の調節を介して、69583タンパク質もしくは85924タンパク質の活性を調節する能力を決定するための方法を、提供する。例えば、これまでに記載されたように、適切な標的に対するエフェクター分子の活性を決定し得るか、またはエフェクターの適切な標的に対する結合を決定し得る。

40

【0220】

50

標的遺伝子産物と、その細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーとの間の相互作用を妨害する化合物を同定するために、標的遺伝子産物および結合パートナーを含有する反応混合物を、2つの産物が複合体を形成し得るような条件下かつそのために十分な時間をかけて、調製する。阻害性因子を試験するために、反応混合物を試験化合物の存在下および非存在下で提供する。試験化合物は、最初に、反応混合物中に含まれ得るか、または標的遺伝子およびその細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーの添加の後のある時点で添加され得る。コントロールの反応混合物を、試験化合物なしでかまたはプラセボと一緒にインキュベートする。次いで、標的遺伝子産物と、細胞性結合パートナーまたは細胞外結合パートナーとの間の任意の複合体の形成を検出する。コントロール反応中で複合体を形成するが、試験化合物を含有する反応混合物中では複合体を形成しないことは、この化合物が標的遺伝子産物と相互作用性結合パートナーとの相互作用を妨害することを示す。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中の複合体形成をまた、試験化合物および変異体標的遺伝子産物を含有する反応混合物中の複合体形成と比較し得る。この比較は、変異体標的遺伝子産物の相互作用を無効化するが、正常な標的遺伝子産物の相互作用は無効化しない化合物を同定することが望ましい場合に、重要であり得る。

10

【0221】

これらのアッセイは、不均一形式または均一形式で行われ得る。不均一系アッセイは、標的遺伝子産物またはその結合パートナーのいずれかを固相上に係留する工程、および反応終了時に固相上に係留された複合体を検出する工程を、包含する。均一系アッセイにおいて、全反応を液相中で実行する。両方のアプローチにおいて、試験される化合物についての差次的な情報を獲得するために、反応物の添加の順序を変化し得る。例えば、標的遺伝子産物とその結合パートナーとの間の相互作用を、例えば、競合によって妨害する試験化合物を、試験基質の存在下で反応を行うことによって同定し得る。あるいは、形成された複合体を無効化する試験化合物（例えば、複合体から成分のうちの1つを置き換える、より高い結合定数を有する化合物）を、複合体が形成した後に反応混合物中に試験化合物を添加することによって試験し得る。種々の形式を、以下に簡潔に記載する。

20

【0222】

不均質のアッセイ系において、標的遺伝子産物または反応性 (i n t e r a c t i v e) 細胞性結合パートナーもしくは細胞外結合パートナーのいずれかは、固体表面（例えば、マイクロタイタープレート）上に固着され、一方で非固着種が直接または間接的に標識される。固着種は、非共有結合または共有結合によって固定され得る。あるいは、固着される種に特異的または選択的な固定化抗体は、固体表面への種の固着のために使用され得る。

30

【0223】

アッセイを行うために、固定化種のパートナーは、試験化合物でコーティングされた表面か、試験化合物でコーティングされていない表面に曝露される。反応が完結した後、未反応の成分が除去され（例えば、洗浄によって）、そして任意の形成された複合体は、固体表面上に固定化されたままである。非固定化種が前標識される場合、表面上に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。非固定化種が前標識されていない場合、間接標識は、表面に固着された複合体を検出するために使用され得る；例えば、始めに非固定化種に特異的なまたは選択的標識抗体を用いて（次いで、抗体は、例えば、標識化抗 I g 抗体で直接標識され得るかまたは間接的に標識され得る）。反応成分の添加の順番に依存して、複合体形成を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が、検出され得る。

40

【0224】

あるいは、この反応は、試験化合物の存在下または非存在下で液体層で実行され得、反応産物は、未反応成分から分離され、そして複合体が検出される；例えば、溶液中で形成される任意の複合体を固着させる結合成分の1つに特異的なまたは選択的な固定化抗体、および固着された複合体を検出する他のパートナーに特異的なまたは選択的な標識化抗体を

50

用いて。再度、液相への反応物の添加の順番に依存して、複合体を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が、同定され得る。

【0225】

本発明の代替の実施形態において、均質のアッセイが使用され得る。例えば、標的遺伝子産物のおよび反応性細胞結合パートナー産物または細胞外結合パートナー産物の予め形成された複合体は、標的遺伝子産物が標識されるか、またはその結合パートナーが標識されるかのいずれかで調製されるが、標識によって生成されるシグナルは、複合体形成に起因してクエンチされる（このアプローチを免疫アッセイのために利用する米国特許第4, 109, 496号を参照のこと）。予め形成された複合体由来の種の1つと競合し、そして置換する試験物質の添加は、バックグラウンドを上回るシグナルの生成を生じる。この方法において、標的遺伝子産物結合パートナー相互作用を破壊する試験物質が、同定され得る。

10

【0226】

なお別の局面において、69583タンパク質もしくは85924タンパク質は、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（例えば、米国特許第5, 283, 317号；Zervosら、(1993) Cell 72: 223~232；Maduraら(1993) J. Biol. Chem. 268: 12046~12054；Bartelら(1993) Biotechniques 14: 920~924；Iwabuchiら(1993) Oncogene 8: 1693~1696；およびBrent WO94/10300を参照のこと）において「ベイト(bait)タンパク質」として使用されて、69583または85924（「69583-結合タンパク質もしくは85924-結合タンパク質」または「69583-bpもしくは85924-bp」と結合または相互作用し、そして69583活性もしくは85924活性に関する他のタンパク質を同定し得る。このような69583-bpまたは85924-bpは、例えば、69583媒介性または85924媒介性のシグナル伝達経路の下流エレメントのような、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583標的もしくは85924標的によるシグナルのアクティベーターまたはインヒビターであり得る。

20

【0227】

ツーハイブリッドシステムは、大半の転写因子のモジュラー性質に基づき、これは別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。手短には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、69583タンパク質もしくは85924タンパク質をコードする遺伝子は、公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ(play)」または「サンプル」）をコードするDNA配列のライブラリー由来のDNA配列は、公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される。（あるいは：69583タンパク質もしくは85924タンパク質は、アクチベータードメインに融合され得る）。「ベイト」タンパク質および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用して69582依存性複合体または85924依存性複合体を形成し得る場合、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、密接に近くにされる。このように近くにすることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結し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され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そして69583タンパク質もしくは85924タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用され得る。

30

40

【0228】

別の実施形態において、69583発現または85924発現のモジュレーターが、同定される。例えば、細胞または細胞を含有しない混合物は、候補化合物と接触させられ、そして69583mRNAもしくは85924mRNAまたは69583タンパク質もしくは85924タンパク質の発現は、候補化合物の非存在下で69583mRNAもしくは85924mRNAまたは69583タンパク質もしくは85924タンパク質の発現の

50

レベルに相関して上昇した。69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下で大きい場合、候補化合物は、69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の発現の刺激因子として同定される。あるいは、69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下でより少ない（統計学的に有意に少ない）場合、候補化合物は、69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の発現のインヒビターとして同定される。69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の発現のレベルが、69583 mRNAもしくは85924 mRNAまたは69583 タンパク質もしくは85924 タンパク質の検出について本明細書中に記載される方法によって決定され得る。

10

【0229】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そして69583 タンパク質または85924 タンパク質の活性を調節する薬剤の能力は、例えば、動物（例えば、アレルギー性気道疾患（AAD）または炎症性障害および呼吸障害（例えば、慢性気管支炎、気管支ぜん息、および気管支拡張症）または造血障害（例えば、白血病）についてのマウスモデル）においてインビボで確認され得る。

【0230】

20

本発明は、さらに上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤に関する。従って、このような薬剤での処置の効果、毒性、副作用、または作用機構を決定するための適切な動物モデルにおいて、本明細書中で記載されるように同定された薬剤（例えば、69583 調節剤もしくは85924 調節剤、アンチセンス69583 核酸分子もしくはアンチセンス85924 核酸分子、69583 特異的抗体もしくは85924 特異的抗体、または69583 結合パートナーもしくは85924 結合パートナー）をさらに使用することは本発明の範囲内である。さらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤は、本明細書中で記載される処置のために使用され得る。

【0231】

（検出アッセイ）

30

本明細書中で同定された核酸配列の一部またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として使用され得る。例えば、これらの配列は、以下のために使用され得る：（i）染色体上のその各々の遺伝子をマップするため（例えば、遺伝性疾患に関連する遺伝子領域を位置決めするため、または69583もしくは85924と疾患を関係付けるため）；（ii）わずかな生物学的サンプルから個体を同定するため（組織型決定）；および（iii）生物学的サンプルの法医学的同定における補助。これらの適用は、以下の小節に記載される。

【0232】

（染色体マッピング）

69583 ヌクレオチド配列または85924 ヌクレオチド配列またはその一部は、69583 遺伝子または85924 遺伝子の位置を染色体上にマッピングするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングといわれる。染色体マッピングは、疾患と関連する遺伝子と69583 配列または85924 配列との相関において有用である。

40

【0233】

手短には、69583 遺伝子または85924 遺伝子は、69583 ヌクレオチド配列または85924 ヌクレオチド配列からPCRプライマー（好ましくは15～25bp長）を調製することによって染色体にマッピングされ得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用され得る。69583 配列または85924 配列に対応するヒト遺伝子を含むこれらのハイブリッドのみが、増幅したフラグメントを産生する。

50

【0234】

各細胞株が、単一のヒト染色体、または少数のヒト染色体、および完全なセットのマウス染色体のいずれかを含む、体細胞ハイブリッドのパネルは、特定のヒト染色体に対する個々の遺伝子の容易なマッピングを可能にし得る (D' E u s t a c h i o ら (1983) *Science* 220: 919-924)。

【0235】

他のマッピングストラテジー (例えば、インサイチュハイブリダイゼーション (F a n ら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6223-27 に記載される)、標識化フローソート染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的 cDNA ライブラリーに対するハイブリダイゼーションによる事前選択) は、染色体の位置に対する 69583 または 85924 のマッピングのために使用され得る。 10

【0236】

中期染色体拡散 (s p r e a d) に対する DNA 配列の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (F I S H) は、1 工程にて正確な染色体位置を提供するためにさらに使用され得る。この F I S H 技術は、500 塩基または 600 塩基程度の長さの DNA 配列を用いて使用され得る。しかし、1, 000 塩基よりも大きいクローンは、特有の染色体位置に結合する傾向が高く、簡単な検出のために十分なシグナル強度を有する。好ましくは、1, 000 塩基、より好ましくは 2, 000 塩基が、適切な時間で良好な結果を得るために十分である。この技術の概説について、V e r m a ら (1988)、*Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k を参照のこと。 20

【0237】

染色体マッピングのための試薬は、単一の染色体またはその染色体の単一部位をマークするために個々に使用され得るか、または試薬のパネルが複数の部位および／または複数の染色体をマークするために使用され得る。遺伝子の非コード領域に対応する試薬は、実際にマッピングの目的のために好ましい。コード配列は、遺伝子ファミリー内でより保存されがちであり、従って、染色体マッピング中のクロスハイブリダイゼーションの機会を増加させる。

【0238】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理学的位置は、遺伝子マップデータと相関し得る (このようなデータは、例えば、J o h n s H o p k i n s U n i v e r s i t y W e l c h M e d i c a l L i b r a r y を介してオンラインで利用可能な M c K u s i c k , M e n d e l i a n I n h e r i t a n c e i n M a n において見出され得る)。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、E g e l a n d ら (1987) *Nature*, 325: 783-787 に記載される、連鎖分析 (物理学的に隣接した遺伝子の共同遺伝 (c o - i n h e r i t a n c e)) によって同定され得る。 30

【0239】

さらに、69583 遺伝子または 85924 遺伝子に関する疾患に罹患した個体と罹患していない個体との間の DNA 配列における相違が、決定され得る。変異が、いくつかまたは全ての罹患した患者において見出されるが、罹患していない患者では見出されない場合、この変異は、特定の疾患の原因因子であるようである。罹患した個体と罹患していない個体との比較は、最初に一般に、染色体における構造的改変 (例えば、その DNA 配列に基づく P C R を用いて染色体拡散から観察可能であるか、または検出可能である欠失または転座) を探すことを含む。最終的に、いくらかの個体由来の遺伝子の完全な配列決定は、変異の存在を確認するため、および多型から変異を区別するために実行され得る。 40

【0240】

(組織型決定)

69583 配列または 85924 配列は、例えば、制限フラグメント長多型 (R F L P) を用いて生物学的サンプルから個体を同定するために使用され得る。この技術において、 50

個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、フラグメントは分離され（例えば、サザンブロットにて）、そしてプローブされて同定のためのバンドを産生する。本発明の配列は、RFLPのためのさらなるDNAマーカーとして有用である（米国特許第5,272,057号に記載される）。

【0241】

さらに、本発明の配列はまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の1塩基ずつのDNA配列を決定するために使用され得る。従って、本明細書中に記載される69583ヌクレオチド配列または85924ヌクレオチド配列は、その配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、個体のDNAを増幅し、次いでその配列を決定するために使用され得る。この様式で調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、特有の個体識別子を提供し得る。なぜならば、それぞれの個体は、対立遺伝子の差異に起因してこのようなDNA配列の特有のセットを有するからである。

10

【0242】

対立遺伝子改変体は、これらの配列のコード領域においてある程度まで生じ、そして非コード領域でかなりの程度生じる。本明細書中に記載される配列の各々は、ある程度まで標準として使用され得、この基準に対して個体由来のDNAが同定の目的のために比較され得る。より多くの数の多型が、非コード領域で生じるために、より少ない配列しか、個体を区別するために必要でない。配列番号1および配列番号4の非コード配列は、それぞれ100塩基の非コード増幅配列を産生する約10~1,000個のプライマーのパネルを用いて、ポジティブな個体の同定を提供し得る。予測されるコード配列（例えば、配列番号3および配列番号6の配列）が使用される場合、ポジティブな個体の同定のためにより適したプライマーの数は、500~2,000である。

20

【0243】

本明細書中に記載される69583ヌクレオチド配列または85924ヌクレオチド配列に由来する試薬のパネルが、個体について特有の識別データベースを作成するために使用される場合、これらの同様の試薬が、個体由来の組織を同定するために後に使用され得る。特有の同定データベースを用いると、生きていても、死んでいても、個体のポジティブな同定は、非常に小さい組織サンプルからなされ得る。

【0244】

（法医学的生物学における部分的69583配列または部分的85924配列の使用）
DNAベースの同定技術はまた、法医学的生物学において使用され得る。このような同定をするために、PCR技術は、組織（例えば、毛髪および皮膚）、または体液（例えば、犯罪現場で見出された血液、唾液、もしくは精液）のような非常に小さい生物学的サンプルから得られたDNA配列を増幅するために使用され得る。次いで、増幅された配列は、標準と比較され得、これによって生物学的サンプルの起源の同定を可能にする。

30

【0245】

本発明の配列は、ポリヌクレオチド試薬（例えば、ヒトゲノム中の特定の遺伝子座に標的化されるPCRプライマー）を提供するために使用され得、これは、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ってDNAベースの法医学的識別子の信頼性を増強し得る。上述のように、実際の塩基配列情報は、制限酵素生成フラグメントによって形成されたパターンに対する正確な代替として、同定のために使用され得る。配列番号1または配列番号4の非コード領域に標的化された配列（例えば、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有する配列番号1または配列番号4の非コード領域由来のフラグメント）は、特にこの使用に適切である。

40

【0246】

本明細書中に記載される69583ヌクレオチド配列または85924ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド試薬（例えば、特定の組織を同定するために例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術で使用され得る標識化プローブまたは標識可能プローブ）を

50

提供するためにさらに使用され得る。これは、法医学者が、未知の起源の組織を示される場合において非常に有用であり得る。このような 6 9 5 8 3 プローブまたは 8 5 9 2 4 プローブのパネルは、種および／または器官型によって組織を同定するために使用され得る。

【0 2 4 7】

類似の様式において、これらの試薬（例えば、6 9 5 8 3 プライマーもしくは 8 5 9 2 4 プライマーまたは 6 9 5 8 3 プローブもしくは 8 5 9 2 4 プローブ）は、汚染について組織培養をスクリーニングするために使用され得る（すなわち、培養物中の異なる型の細胞の混合物の存在についてのスクリーニング）。

【0 2 4 8】

（予測医学）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイおよび治療のモニタリングが、それによって個体を処置するために予後（予測）目的で使用される、予測医学の分野に関する。

【0 2 4 9】

一般に、本発明は、被験体が、病巣に関連する障害についての危険性があるか、または 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 をコードする遺伝子のミス発現か否かを決定する方法を提供する。

【0 2 5 0】

このような障害としては、例えば、6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子のミス発現に関する障害；呼吸系または消化系の障害が挙げられる。

【0 2 5 1】

この方法は、以下の 1 つ以上を包含する：

被験体の組織において、6 9 5 8 3 遺伝子もしくは 8 5 9 2 4 遺伝子の発現に影響する変異の存在もしくは非存在を検出する工程、または遺伝子の発現を制御する領域における変異（例えば、5' 制御領域における変異）の存在もしくは非存在を検出する工程；

被験体の組織において、6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子の構造を改変する変異の存在または非存在を検出する工程；

被験体の組織において、mRNA レベルで 6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子のミス発現を検出する工程（例えば、非野生型の mRNA レベルを検出する工程）；

被験体の組織において、タンパク質レベルで遺伝子のミス発現を検出する工程（例えば、非野生型の 6 9 5 8 3 ポリペプチドまたは 8 5 9 2 4 ポリペプチドのレベルを検出する工程）。

【0 2 5 2】

好ましい実施形態において、この方法は、以下の少なくとも 1 つの存在を確認する工程を包含する：6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子に由来する 1 つ以上のヌクレオチドの欠失；遺伝子への 1 つ以上のヌクレオチドの挿入、点変異（例えば、遺伝子の 1 つ以上のヌクレオチドの置換）、遺伝子の全体の染色体再配列（例えば、転座、逆位、または欠失）。

【0 2 5 3】

例えば、遺伝的病巣を検出するための工程は、以下を包含し得る：（i）配列番号 1 もしくは配列番号 4 に由来するセンス配列もしくはアンチセンス配列または天然に存在するその変異体、または 6 9 5 8 3 遺伝子もしくは 8 5 9 2 4 遺伝子と天然に会合する 5' もしくは 3' の隣接配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ／プライマー、を提供する工程；（ii）プローブ／プライマーを、組織の核酸に曝露する工程；ならびに核酸に対するプローブ／プライマーのハイブリダイゼーション（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション）によって、遺伝的病巣の存在または非存在を検出する工程。

【0 2 5 4】

好ましい実施形態において、ミス発現を検出する工程は、以下の少なくとも 1 つの存在を確認する工程を包含する：6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子のメッセンジャー R

10

20

30

40

50

N A 転写のレベルにおける改変；遺伝子のメッセンジャー R N A 転写の非野生型スプライシングパターンの存在；または非野生型の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 レベル。

【0 2 5 5】

本発明の方法は、出生前か、または被験体の子孫が障害の危険性を有するか否かを決定するために使用され得る。

【0 2 5 6】

好ましい実施形態において、本方法は、6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子の構造、障害の危険性について指標である異常な構造を決定する工程を包含する。

【0 2 5 7】

好ましい実施形態において、本方法は、被験体由来のサンプルを、6 9 5 8 3 タンパク質または 8 5 9 2 4 タンパク質に対する抗体またはその遺伝子と特異的にハイブリダイズする核酸と接触させる工程を包含する。これらおよび他の実施形態は以下に考察される。

【0 2 5 8】

(診断および予後アッセイ)

生物学的サンプル中の 6 9 5 8 3 タンパク質もしくは 8 5 9 2 4 タンパク質または 6 9 5 8 3 核酸もしくは 8 5 9 2 4 核酸の存在、レベル、または非存在は、試験被験体から生物学的サンプルを得ることおよび生物学的サンプル中で 6 9 5 8 3 タンパク質もしくは 8 5 9 2 4 タンパク質または 6 9 5 8 3 核酸もしくは 8 5 9 2 4 核酸の存在が検出されるように、その生物学的サンプルを 6 9 5 8 3 タンパク質もしくは 8 5 9 2 4 タンパク質またはこの 6 9 5 8 3 タンパク質もしくは 8 5 9 2 4 タンパク質をコードする核酸（例えば、m R N A、ゲノム D N A）を検出し得る化合物または薬剤と接触させることによって評価され得る。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および流体を含む。好ましい生物学的サンプルは、血清である。6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子の発現のレベルは、多くの方法で測定され得、この方法として以下が挙げられるがこれらに限定されない：6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子にコードされる m R N A を測定する方法；6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子にコードされるタンパク質の量を測定する方法；または 6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定する方法。

【0 2 5 9】

6 9 5 8 3 遺伝子または 8 5 9 2 4 遺伝子に対応する細胞内の m R N A のレベルは、インサイチュ形式およびインビトロ形式の両方によって決定され得る。

【0 2 6 0】

単離された m R N A は、ハイブリダイゼーションアッセイあるいは増幅アッセイ（サザン解析またはノザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解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）において使用され得る。m R N A レベルの検出のための一つの好ましい診断方法は、単離された m R N A を、検出される遺伝子によってコードされる m R N A にハイブリダイズし得る核酸分子（プローブ）と接触させる工程を包含する。核酸プローブは、例えば、全長の 6 9 5 8 3 核酸または 8 5 9 2 4 核酸（例えば、配列番号 1 または配列番号 4 の核酸）、またはその部分（例えば、少なくとも 7、1 5、3 0、5 0、1 0 0、2 5 0、または 5 0 0 ヌクレオチドの長さであり、そしてストリンジェントな条件下で 6 9 5 8 3 m R N A もしくは 8 5 9 2 4 m R N A または 6 9 5 8 3 ゲノム D N A もしくは 8 5 9 2 4 ゲノム D N A に特異的にハイブリダイズするために十分なオリゴヌクレオチド）であり得る。診断アッセイにおける用途のための他の適切なプローブが、本明細書中に記載される。

【0 2 6 1】

一つの形式において、m R N A（または c D N A）は、例えば、単離された m R N A をアガロースゲルで電気泳動し、ゲルからニトロセルロースのような膜に m R N A を移すことによって表面に固定され、そしてプローブに接触させられる。別の形式において、例えば、下に記載の 2 次元遺伝子チップアレイにおいて、このプローブは、表面に固定され、そ

してmRNA（またはcDNA）が、プローブに接触させられる。当業者は、69583遺伝子または85924遺伝子にコードされるmRNAのレベルを検出する用途のために、公知のmRNA検出方法を採用し得る。

【0262】

69583または85924の1つにコードされるmRNAのサンプル中のレベルは、例えば、rtPCR（Mullis（1987）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）、自己持続性（self sustained）配列複製（Guatelliら、（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874~1878）、転写性増幅システム（Kwohら、（1989）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173~1177）、Q-Beta Replicase（Lizardiら、（1988）Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardiら、米国特許第5,854,033号）または任意の他の核酸増幅方法による核酸増幅（当該分野で公知の技術を使用する増幅化分子の検出が続く）で評価され得る。本明細書中で使用される場合、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域（それぞれプラス鎖およびマイナス鎖、またはその逆も同様）にアニールし得、そして間に短い領域を有する核酸分子の対として規定される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。このようなプライマーは、適切な条件下そして適切な試薬を用いて、プライマーに隣接されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

【0263】

インサイチュ方法に関して、細胞サンプルまたは組織サンプルは、調製／処理され、そして支持体（代表的にはガラススライド）に固定され、そして次いで、解析される69583遺伝子または85924遺伝子をコードするmRNAにハイブリダイズし得るプローブと接触させられ得る。

【0264】

別の実施形態において、この方法は、コントロールサンプルを、69583mRNAもしくは85924mRNAまたは69583ゲノムDNAもしくは85924ゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤と接触させ、そしてコントロールサンプル中の69583mRNAもしくは85924mRNAまたは69583ゲノムDNAもしくは85924ゲノムDNAの存在を試験サンプル中の69583mRNAもしくは85924mRNAまたは69583ゲノムDNAもしくは85924ゲノムDNAの存在と比較する工程をさらに含む。

【0265】

69583または85924にコードされるタンパク質のレベルを決定するために、種々の方法が使用され得る。一般に、これらの方法は、サンプル中のタンパク質レベルを評価するために、このタンパク質に選択的に結合する薬剤（例えば、抗体）をサンプルと接触させる工程を含む。好ましい実施形態において、この抗体は、検出可能な標識を有する。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')₂）が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブまたは抗体の直接標識、および検出可能な物質との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を含むことが意図される。検出可能な物質の例は、本明細書中に提供される。

【0266】

これらの検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中の69583タンパク質または85924タンパク質を検出するために使用され得る。69583タンパク質または85924タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、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）、放射性

免疫アッセイ（RIA）、およびウエスタンブロット解析が挙げられる。69583タンパク質または85924タンパク質の検出のためのインビボ技術としては、被験体中に標識化抗69583抗体または標識化抗85924抗体を導入する技術が挙げられる。例えば、この抗体は、被験体中の存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーで標識され得る。

【0267】

別の実施形態において、これらの方法は、コントロールサンプルを69583タンパク質または85924タンパク質を検出し得る化合物あるいは薬剤と接触させ、そしてコントロールサンプル中の69583タンパク質または85924タンパク質の存在を、試験サンプル中の69583タンパク質または85924タンパク質の存在と比較する工程をさらに包含する。 10

【0268】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける69583または85924の存在を検出するためのキットを含む。例えば、このキットは、生物学的サンプル中の69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583 mRNAもしくは85924 mRNAを検出し得る化合物または薬剤；および標準物質を備え得る。この化合物または薬剤は、適切な容器に充填され得る。このキットは、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583核酸もしくは85924核酸を検出するためにキットを使用するための指示書をさらに備え得る。

【0269】

抗体ベースのキットに関して、このキットは、以下を備え得る：（1）本発明のマーカーに相当するポリペプチドに結合する（例えば、固体支持体に接着された）1次抗体、および、必要に応じて（2）ポリペプチドまたは1次抗体のいずれかに結合し、検出可能な薬剤に結合体化される異なる2次抗体。 20

【0270】

オリゴヌクレオチドベースのキットに関して、このキットは、以下を備え得る：（1）本発明のマーカー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オリゴヌクレオチド（例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド）、または（2）本発明のマーカーに対応する核酸分子を増幅するために有用なプライマー対。このキットはまた、緩衝剤、防腐剤、またはタンパク質安定化剤を備え得る。このキットはまた、検出可能な薬剤（例えば、酵素または基質）を検出するために必要な構成要素を備え得る。このキットはまた、アッセイされ得、そして備えられた試験サンプルと比較され得る、コントロールサンプルまたは一連のコントロールサンプルを備え得る。このキットの各構成要素は、個々の容器内に封入され得、そして種々の容器は全て、このキットを使用して実施されるアッセイの結果を説明するための指示書とともに、単一の包装内であり得る。 30

【0271】

本明細書中に記載される診断方法は、誤って発現された（misexpressed）か、または異常であるか、もしくは望まれない69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性に関連する、疾患または障害を有するか、あるいはこれらの疾患または障害を発症する危険性のある被験体を同定し得る。本明細書中で使用される場合、用語「望まれない」は、生物学的応答（例えば、疼痛）または制御されていない（deregulated）細胞増殖に關与する望まれない現象を含む。 40

【0272】

一つの実施形態において、異常であるか、または望まれない69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性に関連する疾患または障害が同定される。試験サンプルが、被験体から得られ、そして69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583核酸もしくは85924核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）が評価される。ここで、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583核酸もしくは85924核酸のレベル（例えば、存在または非存在）は、異常であるか、または望まれない69583発現もしくは85924発現また 50

は69583活性もしくは85924活性に関連する疾患あるいは障害を有するか、あるいはこれらの疾患または障害を発生する危険性が高い被験体について診断的である。本明細書中で使用される場合、用語「試験サンプル」は、目的の被験体から得られる生物学的サンプル（生物学的流体（例えば、血清）、細胞サンプル、または組織を含む）をいう。

【0273】

本明細書中に記載される予後アッセイは、被験体が、異常であるか、または望まれない69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性に関連する疾患あるいは障害を処置するための薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬剤候補）を投与し得るか否か決定するために使用され得る。例えば、このような方法は、被験体が呼吸性障害（例えば、慢性気管支炎、気管支ぜん息および気管支拡張症）または造血性障害（例えば、白血病、増殖障害および／または分化障害（例えば、肉腫様癌））のための薬剤で効果的に処置され得るか否か決定するために使用され得る。

10

【0274】

本発明の方法はまた、69583遺伝子または85924遺伝子における遺伝性変化を検出するために使用され得、それによって、変更された遺伝子を有する被験体が、69583タンパク質活性もしくは85924タンパク質活性または69583核酸発現もしくは85924核酸発現における誤調節によって特徴付けられる障害（例えば、呼吸性障害、肺障害、増殖障害および／または分化障害、卵巣障害、炎症性障害、腎臓障害、膵臓障害、結腸障害、胸部障害、骨格筋障害、脳障害、視床下部障害、下垂体障害、前立腺障害または心臓血管障害）についての危険性があるか否かを決定する。好ましい実施形態において、この方法は、被験体由来のサンプルにおいて、69583タンパク質もしくは85924タンパク質をコードする遺伝子の強度に影響を及ぼす少なくとも1つの変化、または69583遺伝子もしくは85924遺伝子の誤発現によって特徴付けられる、遺伝的変化の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝的変化は、以下のうちの少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：1）69583遺伝子または85924遺伝子由来の1つ以上のヌクレオチドの欠失；2）69583遺伝子または85924遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；3）69583遺伝子または85924遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；4）69583遺伝子または85924遺伝子の染色体再配置；5）69583遺伝子または85924遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルにおける変化；6）ゲノムDNAのメチル化パターンのような、69583遺伝子または85924遺伝子の異常な改変；7）69583遺伝子または85924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存在；8）69583タンパク質または85924タンパク質の非野生型レベル；9）69583遺伝子または85924遺伝子の対立遺伝子欠失；および10）69583タンパク質または85924タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

20

30

【0275】

変化（a l t e r a t i o n）は、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、または連結鎖反応（LCR）において、プローブ／プライマーなしに検出され得、これらの後者は、69583遺伝子または85924遺伝子における点変異を検出するのに特に有用であり得る。この方法は、以下の工程を包含し得る：被験体から細胞のサンプルを回収する工程；サンプルから核酸（例えば、ゲノム、mRNAもしくはその両方）を単離する工程；69583遺伝子もしくは85924遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅（存在する場合）が生じるような条件下で、核酸サンプルを、69583遺伝子もしくは85924遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程；および増幅産物の存在または非存在を検出する工程；または増幅産物のサイズを検出する工程およびコントロールサンプルと長さを比較する工程。PCRおよび／またはLCRが本明細書中に記載される変異を検出するために使用される任意の技術と組み合わせて、予備増幅工程として使用することが所望され得ることが予測される。あるいは、本明細書中に記載され得るかまたは当該分野で公知の他の増幅法が、使

40

50

用され得る。

【0276】

別の実施形態において、サンプル細胞由来の69583遺伝子または85924遺伝子中の変異が、制限酵素の切断パターンにおける変化を検出することによって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが単離され、（必要に応じて）増幅され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、フラグメント長サイズが、例えば、ゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの差異が、サンプルDNA中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用（例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと）は、リボザイム切断部位の発生または欠失による、特異的変異の存在についてのスコア付けのために使用され得る。 10

【0277】

他の実施形態において、69583または85924中の遺伝的変異がサンプルおよびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA、二次元アレイ（例えば、チップベースアレイ（chip based array）））のハイブリダイゼーションによって同定され得る。このようなアレイは、複数のアドレスを含み、これらの各々は、互いに位置的に区別可能である。異なるプローブは、複数のアドレスの各々に配置される。このアレイは、高密度のアドレスを有し得る（例えば、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る）（Cronin, ら（1996）Human Mutation 7:244-255; Kozal, ら（1996）Nature Medicine 2:753-759）。例えば、69583または85924における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら（前出）に記載されるような光生成DNAプローブを含む二次元アレイ中で同定され得る。簡単にいうと、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイは、連続的な重複プローブの線形アレイを作成することによって配列間の塩基変化を同定するために、サンプルおよびコントロール中のDNAの長いストレッチを介して走査するために使用され得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の後、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さく、特定化されたプローブアレイを使用することによって、特定の変異の特徴付けを可能にする第2ハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、平行プローブセットからなり、一方は、野生型遺伝子に相補的であり、そして他方は、変異遺伝子に相補的である。 20 30

【0278】

なお別の実施形態において、当該分野で公知である任意の種々の配列決定反応は、サンプルの69583配列または85924の配列と、対応する野生型（コントロール）配列との比較によって、69583遺伝子または85924遺伝子の直接的な配列決定および変異の検出に使用され得る。自動化配列決定手段は、診断アッセイ（Naevéら、（1995）Biotechniques 19:448-53）を実施する場合に利用され得、質量分析による配列決定を含む。

【0279】

69583遺伝子または85924遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、RNA/RNAヘテロ二重鎖またはRNA/DNAヘテロ二重鎖中のミスマッチ塩基を検出するために切断剤からの保護が用いられる方法が挙げられる（Myersら（1985）Science 230:1242; Cottonら（1988）Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleebaら（1992）Methods Enzymol. 217:286-295）。 40

【0280】

なお別の実施形態において、このミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルから得た69583cDNAまたは85924cDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二重鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（「DNAミスマッチ修復」酵素とよばれる）を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチにおいてAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジン 50

DNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにおいてTを切断する(Hsuら(1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662; 米国特許第5,459,039号)。

【0281】

他の実施形態において、電気泳動度における変化は、69583遺伝子または85924遺伝子中の変異を同定するために使用される。例えば、単鎖コンフォメーション多型(SSCP)は、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動度の差異を検出するために使用され得る(Oritaら(1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 86:2766, Cotton(1993) *Mutat. Res.* 285:125-144もまた参照のこと; およびHayashi(1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79)。サンプルおよびコントロールの69583核酸または85924核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性されそして再変性され得る。単鎖核酸の2次構造は、配列に従って変化し、電気泳動度において生じる変化は、単一の塩基変化の検出さえも可能にする。DNAフラグメントは、標識化プローブを用いて標識または検出され得る。このアッセイの感受性は、(DNAよりもむしろ)RNAを使用することによって増強され得、2次構造は、配列における変化に対してより感受性である。好ましい実施形態において、本発明の方法は、電気泳動度における変化に基づいて二重鎖のヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を利用する(Keenら(1991) *Trends Genet.* 7:5)。

【0282】

なお別の実施形態において、変性の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)を使用してアッセイされる(Myersら(1985) *Nature* 313:495)。分析法としてDGGEが使用される場合、DNAは、例えば、PCRによって約40bpの高融解性のGCリッチDNAのGCクランプを加えることによって完全に変性しないことを保証するために改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールおよびサンプルのDNAの移動度における差異を同定するために変性勾配の場所において使用される(RosenbaumおよびReissner(1987) *Biophys. Chem.* 265:12753)。

【0283】

点変異を検出するための他の技術の例としては、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が挙げられるが、これらに限定されない(Saikira(1986) *Nature* 324:163); Saikira(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230)。

【0284】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子増幅技術は、本発明と組み合わせて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心(そのために、増幅は差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448)またはプライマーの最後の3'末端において目的の変異を保有し得、ここで、適切な条件下において、ミスマッチは、ポリメラーゼ伸長を防止し得るかまたは減少させ得る(Prossner(1993) *Tibtech* 11:238)。さらに、切断ベースの検出を作成するために変異の領域に新規の制限部位を導入することが所望され得る(Gasparriniら(1992) *Mol. Cell Probes* 6:1)。特定の実施形態において、増幅がまた、増幅のためのTaqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される(Barany(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189)。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端において完璧なマッチが存在する場合にのみ、生じ、この結合は、増幅の存在または非存在を探索することによって特異的部位における既知の変異の存在を検出することを可能にさせる。

【0285】

10

20

30

40

50

本明細書中で記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実行され得、これは、例えば、69583遺伝子または85924遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族の病歴を示す患者を診断するための臨床設定において、便利に使用され得る。

【0286】

(代理マーカーとしての69583分子または85924分子の使用)

本発明の69583分子または85924分子はまた、障害もしくは疾患状態のマーカーとして、疾患状態の前駆体についてのマーカーとして、疾患状態の素因のためのマーカーとして、薬物活性のマーカーとして、または被験体の薬理ゲノム学的プロファイルのマーカーとして有用である。本明細書中に記載される方法を使用して、本発明の69583分子または85924分子の存在、非存在および／または量が検出され得、そしてインビボでの1つ以上の生物学的状態と相関され得る。例えば、本発明の69583分子または85924分子は、1つ以上の障害または疾患状態についての代理マーカーまたは疾患状態に至る状態についての代理マーカーとして作用し得る。本明細書中で使用される場合、「代理マーカー」は、疾患もしくは障害の非存在もしくは存在、または疾患もしくは障害の進行（例えば、腫瘍の存在または非存在）と相関する目的の生物学的マーカーである。このようなマーカーの存在または量は、疾患に依存しない。従って、これらのマーカーは、特定の処置経過が、疾患状態または障害の減少において有効であるか否かを示すために作用し得る。代理マーカーは、疾患状態もしくは障害の存在もしくは程度が、標準的な方法論により評価することが困難な場合（例えば、初期段階腫瘍）、または疾患進行の評価が、潜在的に危険な臨床的終点が達成される前に所望される場合に特に有用である（例えば、心臓血管疾患の評価が、代理マーカーとしてコレステロールレベルを使用してなされ得、そしてHIV感染の分析が、代理マーカーとしてHIV RNAレベルを使用してなされ得、心筋梗塞または十分に進行したAIDSの望ましくない臨床的結果の進行においても同様に）。当該分野における代理マーカーの使用の例としては、以下が挙げられる：Koomenら（2000）J. Mass. Spectrom. 35:258-264；およびJames（1994）AIDS Treatment News Archive 209。

【0287】

本発明の69583分子または85924分子はまた、薬力学的マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬力学的マーカー」は、薬物の効果に特異的に関連する客観的な生化学的マーカーである。薬力学的マーカーの存在または量は、薬物が投与される疾患の状態または障害には関連せず、それ故、このマーカーの存在または量は、被験体における薬物の存在または活性を示す。例えば、薬力学的マーカーは、そのマーカーが、薬物のレベルに対する関係において、この組織の中で、発現するかもしれないか、または発現も転写もされないかのいずれかであるという点において、生物学的組織における薬物の濃度を示し得る。この状態において、薬物の分布または摂取は、薬力学的マーカーによってモニターされ得る。同様に、薬力学的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連し得、その結果、マーカーの存在または量は、インビボでの薬物の相対的分解速度の指標である。薬力学的マーカーは、薬物効果の検出の感度の増加において、特に薬物が低用量で投与される場合に、特に有用である。少量の薬物でさえ、マーカー（例えば69583マーカーまたは85924マーカー）の転写または発現を、複数回活性化するために十分であり得るので、増幅されたマーカーは、薬物そのものよりも容易に検出される量で存在し得る。また、マーカーは、マーカーそのものの性質に起因してより容易に検出され得；例えば、本明細書中に記載される方法を使用して、抗69583抗体または抗85924抗体は、69583タンパク質マーカーもしくは85924タンパク質マーカーのための免疫ベースの検出系に使用され得るか、または69583特異的放射標識プローブもしくは85924特異的放射標識プローブは、69583 mRNAマーカーもしくは85924 mRNAマーカーを検出するために使用され得る。さ

らに、薬力学的マーカーの使用は、直接観測が可能な範囲を超える薬物処置に起因する危険性の機構ベースの予測を提供し得る。当該分野における薬力学的マーカーの使用の例としては、Matsudaら、米国特許第6,033,862号；Hattisら、(1991) Env. Health Perspect. 90:229-238；Schentag (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺3:S21-S24；およびNicolaou (1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺3:S16-S20が挙げられる。

【0288】

本発明の69583分子または85924分子はまた、薬理ゲノム (pharmacogenomic) マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬理ゲノムマーカー」は、被験体における特定の臨床的薬物応答または薬物感受性と関連する客観的な生化学的マーカーである (例えば、McLeodら、(1999) Eur. J. Cancer 35:1650-1652を参照のこと)。薬理ゲノムマーカーの存在または量は、薬物の投与前に、特定の薬物または薬物のクラスに対して予測される被験体の応答に関連する。被験体における1つ以上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、被験体に対して最も適切であり、またはより大きな成功の程度を有すると予測される薬物療法が、選択され得る。例えば、被験体における特定の腫瘍マーカーに対する、RNAまたはタンパク質 (例えば、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583RNAもしくは85924RNA) の存在または量に基づいて、被験体中に存在する可能性のある特定の腫瘍の処置に対して最適化された、薬物または処置の過程が選択され得る。同様に、69583DNAまたは85924DNAにおける特定の配列の変異の存在または非存在は、69583または85924の薬物応答に関連し得る。従って、薬理ゲノムマーカーの使用によって、治療を施与する必要なしに、各被験体に対して最も適切な治療の適用が可能になる。

【0289】

(薬学的組成物)

本発明の核酸およびポリペプチド、これらのフラグメント、ならびに抗69583抗体または抗85924抗体 (本明細書中では、「活性化合物」ともいわれる) は、薬学的組成物に組込まれ得る。このような組成物は、代表的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および薬学的に受容可能なキャリアを包含する。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与と適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。補充活性化合物はまた、組成物に組込まれ得る。

【0290】

薬学的組成物は、その意図される投与の経路に適合するように処方される。投与経路の例としては、非経口投与 (例えば、静脈投与)、皮内投与、皮下投与、経口 (例えば、吸入) 投与、経皮 (局所的) 投与、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用に使用される溶液または懸濁物は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈液 (例えば、注射用の水、生理食塩水、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または他の合成溶媒)；抗菌剤 (例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン)；抗酸化剤 (例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム)；キレート剤 (例えば、エチレンジアミン四酢酸)；緩衝剤 (例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩) および張度の調整のための薬剤 (例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース)。pHは、酸または塩基 (例えば、塩酸または水酸化ナトリウム) で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジまたはガラスもしくはプラスチック製の複数用量バイアル中に封入され得る。

【0291】

注射用途に適する薬学的組成物は、滅菌水溶液 (水溶性の場合) または滅菌分散物および滅菌注射可能な溶液または分散物の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアは、生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor ELTM (B

10

20

30

40

50

ASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) を含む。全ての場合において、組成物は、滅菌状態でなければならず、容易に注射可能である程度まで流動性であるべきである。この組成物は、製造および貯蔵の状態下で安定であるべきであり、細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および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む溶媒または分散剤であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用、分散物の場合、必要な粒子径の維持および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロザールなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール (mannitol)、ソルビトール)、塩化ナトリウム) を組成物中に含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、ステアリン酸モノアルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含有することによって、引き起こされる。

10

【0292】

滅菌注射用溶液は、活性化合物を、必要とされる量で、上記で列挙した成分の1以上の組合せを用いて、適切な溶媒中に取り込ませ、必要に応じて、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒体および上記に列挙された成分のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に取り込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、滅圧乾燥および凍結乾燥であり、これらは、予め滅菌濾過されたその溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる。

20

【0293】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。経口治療投与の目的で、この活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、そして錠剤、トローチ、またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のための流体キャリアを使用して調製され得る。薬学的に適合性の結合剤、および／またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれかまたは同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、トラガントガムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはStearate）；流動促進剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは矯味矯臭剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

30

【0294】

吸入による投与のために、化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0295】

全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段によってなされ得る。経粘膜投与または経皮投与のために、透過されるべき障壁に対して適切な透過剤が、処方物中に使用される。そのような透過剤は、当該分野で一般的に公知であり、そのような透過剤としては、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与のために、活性化合物は、当該分野で一般的に公知であるような、軟膏 (ointment)、軟膏剤 (salve)、ゲル、またはクリームへと処方される。

40

【0296】

化合物はまた、（例えば、カカオ脂および他のグリセリドのような、従来の坐剤基剤を用いて）坐剤の形態で調製され得るか、または経直腸送達のために停留浣腸の形態で調製さ

50

れ得る。

【0297】

1つの実施形態において、活性化合物は、その化合物が身体から迅速に排出されることから保護するキャリアを用いて調製される（例えば、移植物および微小カプセル化送達システムを含む、徐放性処方物）。生分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、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、およびポリ乳酸）が、使用され得る。そのような処方物の調製方法は、当業者にとって明らかである。それらの物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染細胞標的化リポソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

10

【0298】

投与の容易さおよび投与量の均一さのために、単位投薬形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位投薬形態とは、処置される被験体にとっての単位投薬量として適切な、物理的に別個の単位を指す；各単位は、必要な薬学的キャリアに付随して、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。

【0299】

そのような化合物の毒性および治療効力は、例えば、LD₅₀（集団の50%に対して致死である用量）およびED₅₀（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準的薬学的手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、そしてそれは、比LD₅₀/ED₅₀として表され得る。高い治療指数を示す化合物が、好ましい。毒性副作用を示す化合物が使用され得るが、非感染細胞に対して生じ得る損傷を最小にして副作用を低減するために、罹患した組織部位にそのような化合物を標的化する送達システムを設計するために注意が払われるべきである。

20

【0300】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトにおける使用のために一定範囲の投薬量を処方する際に使用され得る。そのような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんど伴わないかまたは全く伴わない、ED₅₀を含む一定範囲の循環濃度内に存在する。その投薬量は、使用される投与形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。本発明の治療方法において使用されるどの化合物についても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイからまず推定され得る。細胞培養において決定されるようなIC₅₀（すなわち、症状の半最大阻害を達成する試験化合物濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて処方され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために、使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

30

【0301】

本明細書中で規定される場合、タンパク質またはポリペプチドの治療上有効な量（すなわち、有効投薬量）は、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは、約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは、約0.1~20mg/kg体重、およびさらにより好ましくは、約1~10mg/kg体重、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。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、さらにより好ましくは約4週間、5週間、または6週間の間、1週間に1回、投与される。特定の要因が、被験体を有効に処置するために必要な投薬量およびタイミングに影響し得ることを当業者は認識し、そのような要因としては、疾患もしくは障害の重篤度、以前の処置、被験体の全身の健康および/または被験体の年齢、ならびに存在する他の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療上有効な量のタンパ

40

50

ク質、ポリペプチド、または抗体（結合体化していないか、または本明細書中に記載のように結合体化されて）を用いる被験体の処置は、単回処置を包含し得、または好ましくは、一連の処置を包含し得る。

【0302】

抗体について、好ましい投薬量は、被験体は、 $0.1\text{ mg}/\text{kg}$ （一般に $10\text{ mg}/\text{kg} \sim 20\text{ mg}/\text{kg}$ ）である。抗体が、脳において作用する場合、 $50\text{ mg}/\text{kg} \sim 100\text{ mg}/\text{kg}$ の投薬量が、通常、適当である。一般的に、部分的なヒト抗体および全長ヒト抗体は、他の抗体よりも人体内でより長い半減期を有する。従って、より低い投薬量およびより少ない投与頻度が、しばしば可能である。例えば、脂質化のような改変は、抗体を安定化し、（例えば、脳への）取り込みおよび組織貫通を強化するために使用され得る。抗体の脂質化の方法は、Cruikshankら、（（1997）J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193）によって記載される。

10

【0303】

本発明は、発現または活性を調節する薬剤を包含する。薬剤は、例えば、低分子であり得る。例えば、そのような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約1,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約500グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0304】

例示的な用量としては、被験体またはサンプルの重量1 kgあたり、ミリグラム量またはマイクログラム量の低分子（例えば、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg} \sim 500\text{ mg}/\text{kg}$ 、約 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{kg} \sim 5\text{ mg}/\text{kg}$ 、または約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg} \sim 50\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ ）が挙げられる。低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性に関するその低分子の能力に依存することが、さらに理解される。これらの低分子のうちの1つ以上が、本発明のポリペプチドまたは核酸の発現もしくは活性を調節するために動物（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医師、または研究者は、例えば、最初に比較的低用量を処方し、その後、適切な応答が得られるまでその用量を増加させ得る。さらに、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、種々の要因（使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、被験体の体重、被験体の全身の健康状態、被験体の性別、および被験体の食餌、投与時期、投与経路、排出速度、任意の薬物の組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む）に依存することが、理解される。

30

【0305】

本発明の核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）または定位注射（例えば、Chenら、（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054~3057を参照のこと）によって、被験体に送達され得る。その遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれた徐放マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクター（例えば、レトロウイルスベクター）が組換え細胞からインタクトで生成され得る場合、その薬学的調製物は、遺伝子送達系を生じる1つ以上の細胞を含み得る。

40

【0306】

薬学的組成物は、投与のための指示書と共に、容器、パック、またはディスペンサー中に含まれ得る。

50

【0307】

(処置方法)

本発明は、異常なまたは望ましくない、69583または85924の、発現または活性と関連した障害に対する危険性がある（もしくはこれらに対して感受性である）か、またはそのような障害を有する被験体を処置する予防法および治療法の両方を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「処置」とは、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を治療、治癒、緩和、軽減、変更、矯正、回復、改善または影響する目的で、それら疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を有する患者に対する治療剤の適用または投与、あるいはこの患者由来の単離された組織または細胞株に対する治療剤の適用または投与として規定される。治療剤としては、低分子、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挙げられるが、これらに限定されない。

【0308】

処置の予防法および治療法の両方の観点で、このような処置は、ゲノム薬理学（pharmacogenomics）の分野から得られる知識に基いて、特異的に仕立てられる（tailor）かまたは改変され得る。本明細書中で使用される場合、「ゲノム薬理学」は、遺伝子配列決定、統計的遺伝学および遺伝子発現分析のようなゲノム技術の、臨床開発および市場での薬物に対する適用をいう。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患者の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）をどのように決定するのかについての研究をいう。よって、本発明の別の局面は、個体の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の69583分子または85924分子あるいは69583調節因子または85924調節因子のいずれかを用いる個体の予防処置または治療処置を仕立てるための方法を提供する。ゲノム薬理学によって、臨床医（clinician）または内科医（physician）は、予防処置または治療処置を、この処置から最も利益を得る患者に対して標的とすることが可能になり、そして毒性薬物関連副作用を被る患者の処置を避けることが可能になる。

【0309】

1つの局面において、本発明は、69583または85924あるいは69583または85924発現または少なくとも1つの69583または85924活性を調節する薬剤を、被験体に投与することによって、被験体において、異常なまたは望まれない69583または85924の発現または活性に関連する疾患または状態を予防する方法を提供する。異常なまたは望まれない69583または85924の発現または活性によって引き起こされるまたはそれに起因する疾患に対する危険性がある被験体は、例えば、本明細書中に記載されるような診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたは組み合わせによって同定され得る。予防剤の投与は、69583または85924の異常に特徴的な症状の発現の前に生じ得、その結果、疾患または障害は、予防されるか、あるいは、その進行が遅延される。69583または85924の異常のタイプに依存して、例えば、69583または85924、69583または85924アゴニスト剤あるいは69583または85924アンタゴニスト剤が、被験体を処置するために使用され得る。適切な薬剤は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

【0310】

いくつかの69583または85924障害は、少なくとも部分的には、異常なレベルの遺伝子産物または異常な活性を示す遺伝子産物の存在によって引き起こされ得る可能性がある。このように、このような遺伝子産物のレベルおよび／または活性の減少は、障害の症状の回復を引き起こす。

【0311】

69583または85924分子は、本明細書中に記載されるような1つ以上の呼吸障害、肺に関連する障害、細胞増殖障害および／または細胞分化障害、腎障害、膵臓障害、卵巣の障害、免疫障害（例えば、炎症障害）、結腸障害、胸部障害、骨格筋障害、脳の障害、視床下部障害、脳下垂体障害、前立腺障害および心臓血管障害を制御するための、新規な診断標的および治療剤として作用し得る。

【0312】

本発明の分子はまた、1つ以上の骨代謝に関連する障害、内皮細胞障害、肝臓障害、ウイルス疾患、疼痛障害、および代謝障害を制御するための、新規な診断標的および治療剤として作用し得る。

【0313】

69583または85924分子の異常な発現および／または活性は、骨代謝に関連する障害を媒介し得る。「骨代謝」は、骨の構造の形成または変性（例えば、骨形成、骨吸収など）における直接または間接の効果をいい、これは、カルシウムおよびリン酸の血清中の濃度に対して最終的に影響し得る。この用語はまた、骨細胞（例えば、破骨細胞および骨芽細胞）中の69583または85924分子によって媒介される活性を含み、この活性は、次いで、骨形成および骨変性を生じ得る。例えば、69583または85924分子は、骨吸収性破骨細胞の異なる活性（単球および単核食細胞の破骨細胞への分化の刺激）を支持し得る。従って、骨細胞の産生を調節する69583または85924分子は、骨形成および骨変性に影響し得、従って、骨障害を処置するために使用され得る。このような障害の例としては、骨粗鬆症、骨形成異常症、骨軟化症、くる病、嚢胞性線維性骨炎、腎性骨形成異常症、骨硬化症、抗痙攣処置、骨減少症、線維形成不全骨（fibrogenesis imperfecta ossium）、続発性上皮小体機能亢進症（secondary hyperparathyroidism）、上皮小体機能低下症、上皮小体機能亢進症、肝硬変症、閉塞性黄疸、薬物誘導代謝、髄様癌、慢性腎性疾患、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授乳熱が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

【0314】

本明細書中で使用される場合、「内皮細胞障害」としては、異常であるか、制御されないか、または所望されない内皮細胞活性（例えば、増殖、移動、新脈管形成、または血管新生）；あるいは細胞表面接着分子または新脈管形成に関連した遺伝子（例えば、TIE-2、FLTおよびFLK）の異常な発現によって特徴付けられる障害が挙げられる。内皮細胞障害としては、腫瘍形成、腫瘍転移、乾癬、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、グレーブズ疾患、虚血性疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）、および慢性炎症疾患（例えば、慢性関節リウマチ）が挙げられる。

【0315】

本明細書中に記載される方法によって処置または診断され得る障害としては、肝臓線維組織における蓄積に関連する障害（例えば、先在する繊維の崩壊および凝縮によって達成される細胞外マトリクスの産生と分解との間の不均衡から生じる障害）が挙げられるがこれに限定されない。本明細書中に記載される方法は、広範に種々の薬剤によって誘導される肝細胞壊死または損傷（恒常性を乱すプロセス（例えば、炎症プロセス、毒性傷害または変更された肝血流から生じる組織損傷）、および感染（例えば、細菌感染、ウイルス感染および寄生生物感染）を含む）を診断または処置するために使用され得る。例えば、本方法は、肝損傷（例えば、門脈圧亢進症または肝性線維症）の早期の検出のために使用され得る。さらに、本方法は、先天性代謝異常に起因する肝性線維症（例えば、ゴシェ病（脂質異常性）または糖原病、A1アンチトリプシン欠損症のような貯蔵障害から生じる線維症；外因性物質の蓄積（例えば、貯蔵）を媒介する障害（例えば、ヘモクロマトーシス（鉄過剰症候群）および銅貯蔵疾患（ウィルソン病）、毒性代謝産物の蓄積を生じる障害（例えば、チロシン血症、果糖血症およびガラクトース血症）およびペルオキシソームの障害（例えば、ツェルバーガー症候群）））を検出するために使用され得る。さらに、本明細書中に記載される方法は、種々の化学物質または薬物（例えば、メトトレキサート、イソニアジド（isoniazid）、オキシフェニサチン、メチルドパ、クロルプロマジン、トルブタミドまたはアルコール）の投与に関連するか、または、これは、脈管障害の肝性発現（例えば、肝臓内胆汁流または肝臓外胆汁流のいずれかの閉塞、あるいは例えば、慢性心不全、肝静脈閉塞病、門脈血栓症またはバドニーキアーリ症候群から生じる肝性循環の変化）を示す肝臓傷害の早期検出および処置のために有用であり得る。

30

40

50

【0316】

さらに、69583または85924分子は、特定のウイルス疾患の病因において重要な役割を果たし得、この病因としては、B型肝炎、C型肝炎および単純疱疹ウイルス（HSV）が挙げられるがこれらに限定されない。69583または85924活性の調節因子は、ウイルス疾患を制御するために使用され得る。調節因子は、ウイルス感染組織またはウイルス関連組織線維症（特に、肝臓および肝臓線維症）の処置および／または診断において使用され得る。また、69583または85924調節因子は、ウイルス関連癌（特に、肝細胞癌）の処置および／診断において使用され得る。

【0317】

さらに、69583または85924は、代謝または疼痛障害の調節において重要な役割を果たし得る。代謝不均衡の疾患としては、肥満、神経性食欲不振、悪液質、脂質障害、および糖尿病が挙げられるがこれらに限定されない。疼痛障害の例としては、通常、痛覚過敏と言及される、種々の形態の組織傷害（例えば、炎症、感染、および虚血）の間に誘発される疼痛応答（例えば、Fields, H. L. (1987) Pain, New York: McGraw-Hillに記載される）；筋骨格障害に関連する疼痛（例えば、関節痛；歯の疼痛；頭痛）；手術に関連する疼痛；過敏な腸症候群に関連する疼痛；または胸部疼痛が挙げられるが、これらに限定されない。

【0318】

議論されるように、69583または85924障害の首尾よい処置は、標的遺伝子産物の発現または活性を阻害する役目を果たす技術によって、もたらされ得る。例えば、ネガティブな調節活性を示すことが証明されている化合物（例えば、上記のアッセイを使用して同定される薬剤）が、本発明に従って使用され、69583障害または85924障害の症状を予防および／または回復し得る。このような分子としては、以下が挙げられ得るがこれらに限定されない：ペプチド、ホスホペプチド、有機低分子または無機低分子、あるいは抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、または単鎖抗体、ならびにFab、F(ab')₂およびFab発現ライブラリーフラグメント、scFV分子、ならびにそれらのエピトープ結合フラグメントを含む）。

【0319】

さらに、標的遺伝子の発現を阻害するアンチセンス分子およびリボザイム分子もまた、本発明に従って使用され、標的遺伝子発現レベルを低下させ得、それによって、標的遺伝子活性レベルは、効果的に減少される。なおさらに、三重らせん分子が、標的遺伝子活性レベルを低下させる際に利用され得る。アンチセンス分子、リボザイム分子および三重らせん分子は、上で議論されている。

【0320】

変異体遺伝子発現を低下または阻害するための、アンチセンス分子、リボザイム分子および／または三重らせん分子の使用もまた、正常な標的遺伝子の対立遺伝子によって産生されるmRNAの転写（三重らせん）および／または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を低下または阻害し得、その結果、存在する正常な標的遺伝子産物の濃度が、正常な表現型で必要とされる濃度よりも低くあり得る可能性がある。このような場合、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および発現する核酸分子は、遺伝子治療法によって、細胞に導入され得る。あるいは、この標的遺伝子が細胞外タンパク質をコードする例において、正常な標的遺伝子タンパク質を、細胞または組織に同時に投与して、必要な細胞活性レベルまたは組織標的遺伝子活性レベルを維持することが、好ましくあり得る。

【0321】

核酸分子が、69583発現または85924発現によって特徴付けられる疾患を処置または予防する際に利用され得る別の方法は、69583タンパク質または85924タンパク質に特異的なアプタマー分子の使用を介する。アプタマーは、三次構造を有する核酸分子であり、これは、タンパク質リガンドに特異的または選択的に結合し得る（例えば、

10

20

30

40

50

Osborneら、(1997) Curr. Opin. Chem Biol. 1: 5-9; および Patel (1997) Curr Opin Chem Biol 1: 32-46を参照のこと)。核酸分子は、多くの場合において、治療タンパク質分子が標的細胞に導入されるよりも、より簡便に標的細胞に導入されるので、アプタマーは、多能性効果を有し得る薬物または他の分子を導入することなく、69583タンパク質活性または85924タンパク質活性が特異的に低下し得る方法を提供する。

【0322】

標的遺伝子産物に特異的であり、かつ標的遺伝子産物活性を低下させる抗体が、作製され得る。従って、このような抗体は、ネガティブな調節技術が、69583または85924の障害の処置に適している場合に投与され得る。抗体の記載については、上記の抗体の節を参照のこと。

10

【0323】

抗体産生を刺激するために、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583エピトープもしくは85924エピトープで、動物またはヒト被験体に注射することが、被験体に対して有害である環境下において、抗イディオタイプ抗体の使用によって、69583または85924に対する免疫応答を生じさせることが可能である（例えば、Herlyn (1999) Ann Med 31: 66-78; ならびに Bhattacharya-Chatterjee および Foon (1998) Cancer Treat Res. 94: 51-68を参照のこと）。抗イディオタイプ抗体が哺乳動物またはヒト被験体に導入される場合、69583タンパク質または85924タンパク質に特異的であるべき、抗-抗イディオタイプ抗体の産生が刺激されるはずである。69583発現または85924発現によって特徴付けられる疾患に対するワクチンもまた、この様式で作製され得る。

20

【0324】

標的抗原が細胞内に存在し、かつ全抗体が使用される例において、内部移行抗体が好ましくあり得る。リポフェクチンまたはリポソームを使用して、標的抗原を細胞内に結合するFab領域の抗体またはフラグメントを送達し得る。抗体のフラグメントが使用される場合、標的抗原に結合する最小の阻害性フラグメントが、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が、使用され得る。あるいは、細胞内標的抗原に結合する一本鎖中和抗体もまた、投与され得る。このような一本鎖抗体は、例えば、標的細胞集団内の一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、投与され得る（例えば、Marascoら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893を参照のこと）。

30

【0325】

標的遺伝子発現、合成および／または活性を阻害する、同定された化合物は、69583または85924の障害を予防、処置または回復するのに治療に有効な用量で、患者に投与され得る。治療に有効な用量とは、その障害の症状を回復させるのに十分な、化合物の量をいう。このような化合物の毒性および治療効果は、上記のような標準的な薬学的手順によって、決定され得る。

【0326】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投薬量範囲を処方する際に、使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんど有さないかまたは全く有さないED₅₀を含む循環濃度範囲内にある。投薬量は、用いられる投薬形態および用いられる投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療に有効な用量は、細胞培養アッセイから、最初に推定され得る。用量は、動物モデルにおいて処方され得、細胞培養物中で決定されるようなIC₅₀（すなわち、症状の最大半減阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲に達する。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定し得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって、測定され得る。

40

50

【0327】

個体に対する有効な用量を決定する別の例は、試験被験体の血清中の「遊離」化合物および「結合」化合物のレベルを直接的にアッセイする能力である。このようなアッセイは、分子のインプリンティング技術によって作製される抗体模倣物および／または「バイオセンサ」を使用し得る。69583活性または85924活性を調節し得る化合物は、テンプレート、または「インプリンティング分子」として使用され、この化合物の触媒試薬との重合化の前に、重合可能な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のその後の除去は、化合物の繰り返し「ネガ(negative image)」を含むポリマーマトリクスを残し、そして生物学的アッセイ条件下で、分子に選択的に再結合することができる。この技術の詳細な総説は、Ansellら(1996) Current Opinion in Biotechnology 7:89-94およびShea(1994) Trends in Polymer Science 2:166-173において参照され得る。このような「インプリントされた」アフィニティマトリクスは、リガンド結合アッセイに適合し、これによって、固定化モノクローナル抗体の構成要素は、適切にインプリントされたマトリクスによって置き換えられる。この方法における、このようなマトリクスの使用の例は、Vlatakisら(1993) Nature 361:645-647において参照され得る。同位体標識の使用によって、69583または85924の発現または活性を調節する化合物の「遊離」濃度は、容易にモニタリングされ得、そしてIC₅₀の算出に使用され得る。

【0328】

このような「インプリントされた」アフィニティマトリクスはまた、光子放射特性が標的化合物の局在性および選択的結合によって測定可能に変化する蛍光官能基を含むように設計され得る。これらの変化は、適切な光ファイバーデバイスを使用し、次いで、試験被験体における用量を、その個々のIC₅₀に基づいて迅速に最適化することによって、実時間で容易にアッセイされ得る。このような「バイオセンサ」の基本的な例は、Krizら(1995) Analytical Chemistry 67:2142-2144において議論されている。

【0329】

本発明の別の局面は、治療目的のための、69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性を調節する方法に関する。従って、例示的な実施形態において、本発明の調節方法は、細胞を、69583もしくは85924またはこの細胞に関連する69583タンパク質活性もしくは85924タンパク質活性の1つ以上の活性を調節する因子と接触させる工程を包含する。69583タンパク質活性または85924タンパク質活性を調節する因子は、本明細書中に記載されるような因子(例えば、核酸またはタンパク質、69583タンパク質または85924タンパク質の天然に存在する標的分子(例えば、69583基質もしくは85924基質または69583レセプターもしくは85924レセプター)、69583抗体もしくは85924抗体、69583アゴニストもしくは85924アゴニストまたは69583アンタゴニストもしくは85924アンタゴニスト、69583アゴニストもしくは85924アゴニストまたは69583アンタゴニストもしくは85924アンタゴニストのペプチド模倣物、または他の低分子)であり得る。

【0330】

1つの実施形態において、この因子は、1つ以上の69583活性または85924活性を刺激する。このような刺激性因子の例としては、活性な69583タンパク質または85924タンパク質および69583または85924をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この因子は、1つ以上の69583活性または85924活性を阻害する。このような阻害因子の例としては、アンチセンス69583核酸分子またはアンチセンス85924核酸分子、抗69583抗体または抗85924抗体、および69583インヒビターまたは85924インヒビターが挙げられる。これらの調節方法は、インビトロにおいてか(例えば、この因子とともに細胞を培養することによって)、

あるいはインビボにおいて（例えば、この因子を被験体に投与することによって）行われ得る。このように、本発明は、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583核酸分子もしくは85924核酸分子の、異常なまたは望ましくない発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患している個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、因子（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される因子）、または69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性を調節する（例えば、アップレギュレートするかまたはダウンレギュレートする）因子の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、69583タンパク質もしくは85924タンパク質または69583核酸分子もしくは85924核酸分子を、低下した、異常なまたは望ましくない69583発現もしくは85924発現または69583活性もしくは85924活性を補償する治療として、投与する工程を包含する。 10

【0331】

69583活性または85924活性の刺激は、69583または85924が異常にダウンレギュレートする状況、および／または69583活性もしくは85924活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。例えば、69583活性または85924活性の刺激は、69583または85924がダウンレギュレートする状況、および／または69583活性もしくは85924活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。同様に、69583または85924活性の阻害は、69583または85924が異常にアップレギュレートする状況、および／または69583活性もしくは85924活性の低下が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。 20

【0332】

（薬理ゲノム学（*pharmacogenomics*））

本発明の69583分子または85924分子、および因子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるような、69583活性または85924活性（例えば、69583遺伝子発現または85924遺伝子発現）に対する刺激効果もしくは阻害効果を有するモジュレーターは、異常な69583活性もしくは85924活性または望ましくない69583活性もしくは85924活性に関連する、69583または85924の関連障害（例えば、細胞増殖および細胞分裂に関連した生化学的変化および形態学的変化の制御、異常なまたは欠損した、細胞増殖障害および／または細胞分化障害、例えば、癌腫、肉腫、転移性障害または造血障害（例えば、白血病）を（予防的にまたは治療的に）処置するために、個体に投与され得る。このような処置とともに、薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と、外来性化合物もしくは薬物に対するその個体の応答との間の関係の研究）が、考慮され得る。治療の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血液濃度との間の関係を変更することによって、毒性または治療不全を与えるように導き得る。従って、医師または臨床医は、69583分子もしくは85924分子または69583モジュレーターもしくは85924モジュレーターを投与するか否かを決定し、そして69583分子もしくは85924分子または69583モジュレーターもしくは85924モジュレーターでの処置における、投薬量および／または治療レジメンを調節する際に、関連する薬理ゲノム学研究において得られた知識の適用を考慮し得る。 30 40

【0333】

薬理ゲノム学は、変更された薬物の性質および罹患した個人の異常な行動に起因する薬物に対する応答における、臨床学的に有意な遺伝的バリエーションを処置する。例えば、Eichelbaumら、（1996）*Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:983-985およびLinderら、（1997）*Clin. Chem.* 43:254-266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学条件は、異なり得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する（変更された薬物作用）単一因子として普及したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する（変 50

更された薬物代謝) 単一因子として普及した。これらの薬理ゲノム学条件は、稀なゲノム欠損としてかまたは天然に存在する多型としてかの、いずれかとして生じ得る。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損 (G6PD) は、一般的な遺伝性酵素病であり、ここで、主な臨床学的合併症は、酸化薬剤 (抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン) の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

【0334】

「ゲノムワイドアソシエーション (genome-wide association)」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための、1つの薬理ゲノム学アプローチは、すでに知られているゲノム関連マーカー (例えば、「二座対立遺伝子」ゲノムマーカーマップ (これは、60,000~100,000の多型またはヒトゲノム上の可変性部位からなり、これらの各々が、2つの改変体を有する)) からなるヒトゲノムの高解像度マップに、主に依存する。このような高解像度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、第II期/第III期の薬物試行に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高解像度マップは、ヒトゲノムにおいて、数千万の公知の一塩基多型 (SNP) の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」は、DNAのストレッチにおいて、単一ヌクレオチド塩基において生じる一般的な変更である。例えば、SNPは、DNAの1000塩基毎に1回起こり得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連し得ない。このようなSNPの発生に基づくゲノムマップが与えられると、個体は、個々のゲノムにおいて、SNPの特定のパターンに依存して、ゲノムのカテゴリーに分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、ゲノム学的に類似の個体の間で共通であり得る特性を考慮して、このようなゲノム学的に類似の個体の群に対して変更され得る。

10

20

【0335】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法は、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物の標的をコードする遺伝子が既知である場合 (例えば、本発明の69583タンパク質または85924タンパク質)、その遺伝子の全ての共通の改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョンを有することが特定の薬物応答に関連するか否かが決定され得る。

30

【0336】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。例えば、薬物 (例えば、本発明の69583分子もしくは85924分子または69583モジュレーターもしくは85924モジュレーター) を投薬された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が狙撃されるか否かの指標を与え得る。

【0337】

1より多い上記薬理ゲノム学アプローチから得られる情報を使用して、個体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定し得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害反応または治療不全を回避し得、それによって、69583分子もしくは85924分子または69583モジュレーターもしくは85924モジュレーター (例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイのうちの1つによって同定されるモジュレーター) で被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強させる。

40

【0338】

本発明はさらに、本発明の69583遺伝子または85924遺伝子の1つ以上によってコードされる遺伝子産物の1つ以上の活性を調節する因子の同定に基づく、新たな因子、または組み合わせを同定するための方法を提供し、ここで、これらの産物は、治療因子に対する細胞の耐性に関連し得る。詳細には、本発明の69583遺伝子または85924遺伝子によってコードされるタンパク質の活性は、因子の耐性を克服するために、因子を

50

同定するための基礎として使用され得る。耐性タンパク質の1つ以上の活性をブロックすることによって、標的細胞（例えば、ヒト細胞）は、未改変標的細胞に耐性である因子を用いた処置に対して感受性になる。

【0339】

69583タンパク質または85924タンパク質の発現または活性に対する、因子（例えば、薬物）の影響のモニタリングが、臨床試験において適用され得る。例えば、69583遺伝子発現または85924遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートした69583活性または85924活性を増加させるために、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、69583遺伝子発現または85924遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートした69583活性または85924活性の低下を示す被験体の臨床試験において、モニタリングされ得る。あるいは、69583遺伝子発現または85924遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートした69583活性または85924活性を低下させるために、スクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、69583遺伝子発現または85924遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートした69583活性または85924活性の増加を示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。このような臨床試験において、69583遺伝子または85924遺伝子の発現または活性、好ましくは、例えば、タンパク質キナーゼ関連障害または別の69583または85924の関連障害に関与している他の遺伝子の発現または活性は、「読み出し（read out）」または特定の細胞の表現型のマーカーとして、使用され得る。

【0340】

（他の実施形態）

別の局面において、本発明は、複数の捕捉プローブの分析方法を特徴とする。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二次元アレイを提供する工程（複数のアドレスの各アドレスは、複数のアドレスの互いのアドレスと位置的に識別可能であり、複数のアドレスの各アドレスは、固有の捕捉プローブ（例えば、核酸配列またはペプチド配列）を有し、捕捉プローブは、69583または85924を発現する細胞または被験体由来であるかあるいは69583または85924の媒介応答が誘発される細胞または被験体由来である）；このアレイを69583核酸もしくは85924核酸（好ましくは精製されたもの）、69583ポリペプチドもしくは85924ポリペプチド（好ましくは精製されたもの）、または抗69583抗体もしくは抗85924抗体と接触させる工程、およびそれによって複数の捕捉プローブを評価する工程、を包含する。結合（例えば、核酸の場合、複数のアドレスのうちの1つのアドレスにおける捕捉プローブとのハイブリダイゼーション）は、例えば、69583核酸もしくは85924核酸、69583ポリペプチドもしくは85924ポリペプチド、または69583抗体もしくは85924抗体に結合された標識から生成されるシグナルによって検出される。

【0341】

捕捉プローブは、選択されたサンプル由来の核酸のセット（例えば、コントロールまたは未刺激組織もしくは細胞由来の核酸のサンプル）であり得る。

【0342】

この方法は、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のアレイと、69583核酸もしくは85924核酸、69583ポリペプチドもしくは85924ポリペプチド、または69583抗体もしくは85924抗体とを接触させる工程を包含し得る。各々のハイブリダイゼーションの結果は、例えば、第1のサンプルと第2のサンプルとの間の発現における差を分析するために比較され得る。第1の複数の捕捉プローブは、コントロールサンプル（例えば、野生型サンプル、正常サンプル、または非疾患サンプル、非刺激サンプル（例えば、生物学的流体サンプル、組織サンプル、または細胞サンプル））由来であり得る。第2の複数の捕捉プローブは、実験サンプル（例えば、変異型サンプル、危険サンプル、疾患状態サンプルもしくは障害状態サ

ンプル、または刺激サンプル（例えば、生物学的流体サンプル、組織サンプル、または細胞サンプル）由来であり得る。

【0343】

複数の捕捉プローブは、複数の核酸プローブであり得、それらの各々は、69583または85924の対立遺伝子と特異的にハイブリダイズする。このような方法は、例えば、疾患または障害に対する危険を評価するために、被験体に対する選択された処置の感度を評価するために、被験体が疾患または障害を有するか否かを評価するために、被験体を診断するのに使用され得る。

【0344】

この方法は、上記のようにSNPを検出するのに使用され得る。

10

【0345】

別の局面において、本発明は、69583または85924を分析する（例えば、構造、機能または他の核酸配列もしくはアミノ酸配列との関連を分析する）方法の特徴とする。この方法は、69583核酸配列もしくは85924核酸配列または69583アミノ酸配列もしくは85924アミノ酸配列を提供する工程；69583配列または85924配列と、配列の集合（例えば、核酸またはタンパク質の配列データベース）からの1つ以上の（好ましくは複数の）配列とを比較する工程、を包含し、それによって69583または85924を分析する。

【0346】

この方法は、69583配列または85924配列とデータベース配列との間の配列同一性を評価する方法を包含し得る。この方法は、第2の位置の（例えば、インターネットを通じて）データベースにアクセスすることによって実施され得る。好ましいデータベースとしては、GenBankTM およびSwissProtが挙げられる。

20

【0347】

別の局面において、本発明は、例えば、SNPを同定するのにあるいは69583または85924の特定の対立遺伝子を同定するのに有用なオリゴヌクレオチドのセットを特徴とする。このセットは、複数のオリゴヌクレオチドを含み、それらの各々は、質問位置（interrogation position）（例えば、SNPまたは変異部位）に異なるヌクレオチドを有する。好ましい実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、互いに配列において同一である（長さの差を除く）。オリゴヌクレオチドには、異なる標識が提供され得、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の対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドと識別可能なシグナルを提供する。

30

【0348】

69583分子または85924分子の配列は、その使用を容易にするため、種々の媒体において提供される。配列は、単離された核酸分子またはアミノ酸分子ではなく、69583分子または85924分子を含む製品として提供され得る。このような製品は、天然で存在するようにまたは精製された形態で、ヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列、またはそのサブセットの試験に対して直接的には適用可能でない手段を用いる製品の試験を可能にする形態で、ヌクレオチド配列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）を提供し得る。

40

【0349】

69583または85924のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、コンピューター読取り媒体へ記録され得る。本明細書で 사용되는場合、「コンピューター読取り媒体」は、コンピューターによって直接読み取られ得、そしてアクセスされ得る任意の媒体をいう。このような媒体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：磁気保存媒体（例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク保存媒体、および磁気テープ）；光学保存媒体（例えば、コンパクトディスクおよびCD-ROM）；電気保存媒体（例えば、RAM、ROM、EPROM、EEPROMなど）；ならびに一般的なハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド体（例えば、磁氣的／光学保存媒体

50

）。媒体は、それらに対して本発明の 6 9 5 8 3 配列情報または 8 5 9 2 4 配列情報を有するように適合または構成される。

【0350】

本明細書で使用される場合、用語「電気装置」は、データまたは情報を保存するために構成または適合された他のデバイスの任意の適切なコンピューター装置または処理装置を包含することが意図される。本発明の使用に適切な電気装置の例としては、以下が挙げられる：独立型コンピューター装置；ネットワーク（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、およびエキストラネットを含む）；電気製品（例えば、パーソナルデジタルアシスタント（PDA）、セルラー電話、ポケットベルなど）；および局所処理システムおよび分布処理システム。

10

【0351】

本明細書で使用される場合、「記録された」は、電気装置読取り媒体上の情報を保存するかまたは暗号化するための処理をいう。当業者は、公知の媒体上に情報を記録するための現在において公知の任意の方法を容易に適合させて、6 9 5 8 3 配列情報または 8 5 9 2 4 配列情報を含む製品を生成し得る。

【0352】

種々のデータ保存構造体が、それらの上に記録された本発明の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有するコンピューター読取り媒体を作製するために当業者に対して利用可能である。データ保存構造多の選択は、一般的に、保存情報にアクセスするために選択された手段に基づく。さらに、種々のデータ処理プログラムおよびフォーマットを使用して、コンピューター読取り媒体上に、本発明のヌクレオチド配列情報を保存し得る。配列情報は、文字処理テキストファイルにおいて表現され得、これらのファイルは、市販のソフトウェア（例えば、Word Perfect および Microsoft Word）でフォーマットされているか、またはデータベースアプリケーション（例えば、DB2、Sybase、Oracle、など）に保存される ASCII ファイルの形態で表現されている。当業者は、記録された本発明のヌクレオチド配列情報をそれらの上に有するコンピューター読取り媒体を得るために、任意の数のデータ処理装置構築フォーマット（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を容易に適合させ得る。

20

【0353】

本発明の 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をコンピューター読取り形態に提供することによって、当業者は、種々の目的のために配列情報に定型的にアクセスし得る。例えば、当業者は、コンピューター読取り形態中の本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を使用し、標的配列または標的構造モチーフとデータ保存手段内に保存された配列情報とを比較し得る。検索を使用して、特定の標的配列または標的モチーフに適合する本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

30

【0354】

それゆえに、本発明は、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害に対する素因を有するか否かを決定する方法を実施するための指示書を保有するための媒体を提供し、ここで、この方法は、被験体に関連する 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 配列情報を決定する工程を包含し、そして 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 配列情報に基づいて、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか否かを決定する工程および／またはこの疾患状態、障害状態、あるいは疾患前状態に対する特定の処置を勧める工程を包含する。

40

【0355】

本発明はさらに、電気システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 に関連する疾患に対する

50

素因を有するか否かを決定する方法を提供し、ここで、この方法は、被験体に関連する 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 配列情報を決定する工程を包含し、そして 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 配列情報に基づいて、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか否かを決定する工程および／またはこの疾患状態、障害状態、あるいは疾患前状態に対する特定の処置を勧める工程を包含する。この方法はさらに、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程および／または被験体に関連するネットワーク表現型情報から取得する工程を包含する。

【0356】

10

本発明はまた、ネットワークにおいて、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 に関連する疾患あるいは障害に対する素因を有するか否かを決定する方法を提供し、この方法は、被験体から 6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 配列情報および／またはそれらに関連する情報を受け取る工程、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 関連疾患または障害に対応する情報および／またはプロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害に対応する情報、または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害に対応する情報をネットワークから取得する工程を包含し、表現型情報、6 9 5 8 3 情報または 8 5 9 2 4 情報（例えば、配列情報および／またはそれらに関連する情報）

20

【0357】

本発明はまた、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 に関連する疾患あるいは障害に対する素因を有するか否かを決定するビジネス方法を提供し、この方法は、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 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）を受け取る工程、被験体に関連する表現型情報を受け取る工程、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 に関連し、そして／またはプロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害に関連するネットワークについての情報を取得する工程、ならびに表現型情報、6 9 5 8 3 情報または 8 5 9 2 4 情報、および取得された情報のうちの 1 つ以上に基づいて、被験体が、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害を有するか、または、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の 6 9 5 8 3 もしくは 8 5 9 2 4 関連疾患あるいは障害に対する素因を有するか否かを決定する工程を包含する。この方法は、この疾患状態、障害状態、あるいは疾患前状態に対する特定の処置を勧める工程をさらに包含する。

30

40

【0358】

本発明はまた、本発明の 6 9 5 8 3 配列または 8 5 9 2 4 配列を含むアレイを含む。このアレイを使用して、アレイにおける 1 以上の遺伝子の発現をアッセイし得る。1 つの実施形態において、アレイを使用して、アレイにおける遺伝子の組織特異性を確認するために、組織における遺伝子発現をアッセイし得る。この様式では、約 7 6 0 0 までの遺伝子を、発現のために同時にアッセイし得、このうちの 1 つは、6 9 5 8 3 または 8 5 9 2 4 であり得る。このことにより、プロファイルが、1 つ以上の組織において特異的に発現される 1 対の遺伝子を示しながら発生することを可能にする。

50

【0359】

このような定性的な情報に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。従って、確認可能であるならば、組織特異性だけでなく、組織における1対の遺伝子の発現レベルも定量される。従って、遺伝子は、それらの組織発現自体およびその組織における発現のレベルに基づいてグループ化され得る。このことは、例えば、組織における遺伝子発現の関係を確認するのに有用である。従って、1つの組織は、摂動され得、そして第2の組織における遺伝子発現に対する効果が、決定され得る。この文脈において、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効果が、決定され得る。このような決定は、例えば、遺伝子発現のレベルでの細胞-細胞相互効果の効果をj知るのに有用である。薬剤を治療的に投与して、1つの細胞型を処置するが、別の細胞型に対しては所望でない効果を有する場合、本発明は、所望でない効果の分子基礎を決定するためのアッセイを提供し、従って、中和薬剤を同時投与する機会を提供するか、そうでなければ所望でない効果を処置するための機会を提供する。同様に、単一の細胞型内でさえ、所望でない生物学的効果は、分子レベルで決定され得る。従って、薬剤の標的遺伝子以外の発現に対する効果を、確認および中和し得る。

10

【0360】

別の実施形態において、アレイを使用して、アレイにおける1以上の遺伝子の発現の時間経過をモニタリングし得る。このことは、本明細書で記載されるように、種々の生物学的な局面、例えば、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の69583または85924関連疾患あるいは障害の発生、プロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の69583または85924関連疾患あるいは障害の進行、ならびにプロテインキナーゼ関連疾患もしくは障害または別の69583または85924関連疾患あるいは障害に関連する細胞形質転換のようなプロセスにおいて生じ得る。

20

【0361】

アレイはまた、同じ細胞または異なる細胞における遺伝子発現の他の遺伝子発現に対する効果を確認（例えば、他の遺伝子の発現に対する69583または85924発現の効果を確認する）するのに有用である。最後の標的または下流の標的が、調節され得ない場合に、このアレイは、例えば、治療的介入のための代替の分子標的の選択を提供する。

【0362】

アレイはまた、正常細胞および異常細胞における1以上の遺伝子の異なる発現パターンを確認するのに有用である。このアレイは、診断または治療的介入のための分子標的として機能し得る1対の遺伝子（例えば、69583または85924が挙げられる）を提供する。

30

【0363】

本明細書で使用される場合、「標的配列」は、6以上のヌクレオチドの任意のDNA配列または2以上のアミノ酸の任意のアミノ酸配列であり得る。当業者は、標的配列が長くなるほど、標的配列は、データベースにおいてランダム発生として存在する可能性が低くなることを容易に理解しうる。標的配列の代表的な配列長さは、約10～約100アミノ酸または約30～約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処理に関連する商業的に重要なフラグメント（例えば、配列フラグメント）は、長さがより短いものであり得ることが十分に認識される。

40

【0364】

コンピューターソフトウェアは、公共的に利用可能であり、これは、当業者が、分析および他の配列との比較のためのコンピューター読取り媒体に提供された配列情報にアクセスすることを可能にする。種々の公知のアルゴリズムが、公共的に開示され、検索手段を実施するための種々の市販のソフトウェアが、本発明のコンピューターベースのシステムにおいて使用されており、そして使用され得る。このようなソフトウェアの例としては、MacPattern (EMBL)、BLASTNおよびBLASTX (NCBI) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0365】

50

従って、本発明は、69583配列または85924配列のコンピューター読取りマトリックス上の記録配列を含む配列のコンピューター読取り記録を作成するための方法の特徴とする。好ましい実施形態において、この記録は、以下の1以上を含む：ORFの同定；ドメイン、領域、または部位の同定；転写開始の同定；転写終末因子の同定；タンパク質の全長アミノ酸配列、またはその成熟形態；翻訳領域の5'末端。

【0366】

別の局面において、本発明は、配列を分析する方法の特徴とする。この方法は、以下の工程を包含する：コンピューター読み取り形態中の69583または85924の配列または記録を提供する工程；第2の配列と69583または85924の配列とを比較する工程；それによって、配列を分析する工程。比較は、配列と配列同一性とを比較する工程、または1つの配列が、他方の配列内に含まれるか否かを決定する工程（例えば、69583または85924の配列が、比較される配列を含むか否かを決定する工程）を包含し得る。好ましい実施形態において、69583もしくは85924の配列または第2の配列は、第1のコンピューター上（第1の部位に）保存され、比較が実施され、読取られ、または第2のコンピューター（例えば、第2の部位）に記録される。例えば、69583もしくは85924の配列または第2の配列は、1つのコンピューターにおける公共または専用のデータベースに保存され得、そして比較の結果が実施され、読取られ、または第2のコンピューター上に記録され得る。好ましい実施形態において、この記録は、以下の1以上を含み得る：ORFの同定；ドメイン、領域、または部位の同定；転写開始の同定；転写終結因子の同定；タンパク質の全長アミノ酸配列、またはその成熟形態；翻訳領域の5'末端。

【0367】

本発明は、以下の実施例（限定として解釈されるべきでない）によって実証される。

【実施例】

【0368】

（遺伝子発現分析）

全RNAを、製造者の指示書（TelTest, Inc）に従い、RNA STAT-60を用いて、単一工程抽出方法により種々のヒト組織から調製した。各RNA調製物を、37℃で1時間、DNase I（Ambion）で処理した。DNase I処理を測定し、サンプルが、内部増幅参照としてβ2ミクログロブリンを用いて、蛍光の閾値レベルにまで到達するように少なくとも38回のPCR増幅サイクルを必要とする場合に完了した。DNase I処理に続いて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り確認した。フェノール抽出後、cDNAを、製造者の指示書（GibcoBRL）に従ってSUPERSCRIPTTM Choice Systemを用いて、サンプルから調製した。逆転写酵素を含まないRNAのネガティブコントロールを、各RNAサンプルについて擬似逆転写した。

【0369】

ヒト69583発現またはヒト85924発現を、種々の正常ヒト組織細胞株および罹患する（例えば、癌性）ヒト組織細胞株から調製されたcDNA中でのTaqMan（登録商標）定量PCR（Perkin Elmer Applied Biosystems）により測定した。

【0370】

プローブを、ヒト69583遺伝子およびヒト85924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69583遺伝子およびヒト85924遺伝子のプローブを、FAM（6-カルボキシフルオレセイン）を用いて標識し、β2-ミクログロブリン参照プローブを、異なる蛍光染色、VICを用いて標識した。標的遺伝子および内部参照遺伝子の差別的標識は、従って、同じウェルでの測定を可能にした。順方向プライマーおよび逆方向プライマーならびにβ2-ミクログロブリンおよび標的遺伝子の両方についてのプローブを、TaqMan（登録商標）Universal PCR Master Mix（PE Appl 50

ied Biosystems) に添加した。プライマーおよびプローブの最終濃度は変化し得たが、各々は、所定の実験では内部では一定であった。代表的な実験は、200 nMの順方向プライマーおよび逆方向プライマー+100 nMの β 2-ミクログロブリンに対するプローブならびに600 nMの順方向プライマーおよび逆方向プライマー+200 nMの標的遺伝子に対するプローブを含んだ。TaqManマトリックス実験を、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) 上で実施した。熱サイクル条件は、以下の通りであった：50℃で2分および95℃で10分保持し、ついで、2ステップPCRを、95℃で15秒に続いて60℃で1分を40サイクル。

【0371】

以下の方法を使用して、同じ組織における β 2-ミクログロブリン発現に対する種々の組織におけるヒト69583遺伝子発現およびヒト85924遺伝子発現を定量的に計算した。閾値サイクル(Ct)値を、蛍光において統計学的に有意な増加が検出されるサイクルとして規定する。より低いCt値は、より高いmRNA濃度を示す。ヒト69583遺伝子およびヒト85924遺伝子のCt値を、 β 2-ミクログロブリン遺伝子のCt値を減算することによって正規化し、以下の式を用いて Δ Ct値を得る： Δ Ct = Ct_{ヒト69583} - Ct _{β 2-ミクログロブリン}。次いで、発現を、比較的低いレベルのヒト69583遺伝子およびヒト85924遺伝子の発現を示すcDNAサンプルに対して計算する。次いで、検定物質サンプルについての Δ Ct値を、以下の式に従って、各組織サンプルについての Δ Ctから減算する： $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct_{サンプル} - Δ Ct_{検定物質}。次いで、比較発現を、 $2^{-\Delta\Delta$ Ct}で与えられる演算式を用いて計算する。次いで、試験した各々の組織における標的ヒト69583遺伝子および標的ヒト85924遺伝子の発現を、以下により議論されるように図表を用いて表わす。

【0372】

この結果は、正常腎臓サンプル、正常脾臓サンプル、肺腫瘍サンプルおよび卵巣腫瘍サンプルにおいてかなりの69583発現を示し、ならびに結腸腫瘍サンプルおよび胸部腫瘍サンプルにおける中程度の発現を示す。さらに、この結果は、正常脾臓サンプル正常骨格筋サンプル、正常大脳皮質サンプル、正常視床下部サンプル、正常下垂体サンプル、前立腺腫瘍サンプル、肺腫瘍サンプルおよびうっ血性心不全サンプルにおいてかなりの85924発現を示す。

【0373】

本願全体に引用される全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、本明細書で参考として援用される。

【0374】

(等価物)

当業者は、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を、わずかの定型の実験を用いて認識し、確認し得る。

【図面の簡単な説明】

【0375】

【図1】図1は、ヒト69583のヒドロパシープロットを示す。比較的疎水性の残基を水平破線よりも上に示し、比較的親水性の残基は水平破線よりも下にある。システイン残基(cys)を、ヒドロパシートレースのすぐ下の短い垂直線によって示す。ヒト69583のアミノ酸配列に対応する番号を示す。本発明のポリペプチドとしては、以下を含むフラグメントが挙げられる：疎水性配列(例えば、破線より上の配列)の全てもしくは一部(例えば、配列番号2の約アミノ酸329~337、約345~355、約391~400、約723~738および約902~920の配列)；親水性配列(例えば、破線より下の配列)の全てもしくは一部(例えば、配列番号2の約アミノ酸50~61、約220~231、約292~302、約380~390、約410~422、約432~445、約452~470、約490~511、約531~545、約561~571、約580~591、約601~611、約641~651、約653~661、約675~6

10

20

30

40

50

91、約751～761、約765～775、約882～901および約1002～1012の配列)；Cysを含む配列、またはグルコシル化部位。

【図2】図2は、ヒト85924のヒドロパシープロットを示す。比較的疎水性の残基を水平破線よりも上に示し、比較的親水性の残基は水平破線よりも下にある。システイン残基(cys)を、ヒドロパシートレースのすぐ下の短い垂直線によって示す。ヒト85924のアミノ酸配列に対応する番号を示す。本発明のポリペプチドとしては、以下を含むフラグメントが挙げられる：疎水性配列(例えば、破線より上の配列)の全てもしくは一部(例えば、配列番号5のアミノ酸約361～約371、約721～約732、約761～約771、約821～約841、約970～約982、約1375～約1390、約1431～約1445、および約2124～約2134の配列)；親水性配列(例えば、破線より下の配列)の全てもしくは一部(例えば、配列番号5のアミノ酸約18～約31、約151～約171、約211～約231、約465～約481、約540～約551、約570～約582、約861～約875、約1051～約1065、約1101～約1121、約1200～約1218、約1280～約1300、約1411～約1425、約1591～約1601、約1620～約1640、約1661～約1671、約1740～約1755、約1812～約1840、約1880～約1891、約1911～約1921、約1970～約1990、約2040～約2052、約2080～約2091および約2170～約2180の配列)；Cysを含む配列、またはグルコシル化部位。

【国際公開パンフレット】

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

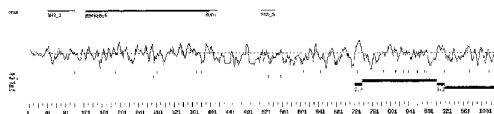
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035840 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/34037
(22) International Filing Date: 24 October 2002 (24.10.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/338,690 24 October 2001 (24.10.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/AU]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
(72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): KAPELLER-LIBERMANN, Rosana [BR/US]; 86 Beacon Street, Chestnut Hill, MA 02467 (US); SPURLING, Heidi, Lynn [US/AU]; 718 Salem Street, Apartment 3, Malden, MA 02148 (US).
(74) Agent: SIOUSSAT, Tracy, M.; Intellectual Property Group, Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CIL, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EL, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GL, GH, GM, GR, 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, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, 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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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: 69583 AND 85924, NOVEL HUMAN PROTEIN KINASE FAMILY MEMBERS AND USES THEREOF



(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated 69583 and 85924 nucleic acid molecules, which encode novel protein kinase family members. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing 69583 or 85924 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and nonhuman transgenic animals in which a 69583 or 85924 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated 69583 or 85924 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-69583 or -85924 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

WO 03/035840 A2

WO 03/035840

PCT/US02/34037

**69583 AND 85924, NOVEL HUMAN PROTEIN KINASE FAMILY MEMBERS
AND USES THEREFOR**

Cross-References to Related Applications

- 5 [0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Number 60/338,690 filed October 24, 2001, the contents of which are incorporated herein by this reference.

Background of the Invention

- 10 [0002] Phosphate tightly associated with protein has been known since the late nineteenth century. Since then, a variety of covalent linkages of phosphate to proteins have been found. The most common involve esterification of phosphate to serine, threonine, and tyrosine with smaller amounts being linked to lysine, arginine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, and cysteine. The occurrence of phosphorylated proteins implies the existence of one or more protein kinases capable of phosphorylating amino
- 15 acid residues on proteins, and also of protein phosphatases capable of hydrolyzing phosphorylated amino acid residues on proteins.
- [0003] Protein kinases play critical roles in the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division (D'Urso, G. et al. (1990) *Science* 250: 786-791; Birchmeier, C. et al. (1993) *Bioessays* 15: 185-189). They
- 20 serve as growth factor receptors and signal transducers and have been implicated in cellular transformation and malignancy (Hunter, T. et al. (1992) *Cell* 70: 375-387; Posada, J. et al. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3: 583-592; Hunter, T. et al. (1994) *Cell* 79: 573-582). For example, protein kinases have been shown to participate in the transmission of signals from growth-factor receptors (Sturgill, T. W. et al. (1988) *Nature* 344: 715-718;
- 25 Gomez, N. et al. (1991) *Nature* 353: 170-173), control of entry of cells into mitosis (Nurse, P. (1990) *Nature* 344: 503-508; Maller, J. L. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 269-275) and regulation of actin bundling (Husain-Chishti, A. et al. (1988) *Nature* 334: 718-721). Protein kinases can be divided into two main groups based on either amino acid sequence similarity or specificity for either serine/threonine or tyrosine residues. A small
- 30 number of dual-specificity kinases are structurally like the serine/threonine-specific group. Within the broad classification, kinases can be further sub-divided into families whose members share a higher degree of catalytic domain amino acid sequence identity and also have similar biochemical properties. Most protein kinase family members also

WO 03/035840

PCT/US02/34037

share structural features outside the kinase domain that reflect their particular cellular roles. These include regulatory domains that control kinase activity or interaction with other proteins (Hanks, S.K. et al. (1988) *Science* 241: 42-52).

- [0004] Extracellular signal-regulated kinases/mitogen-activated protein kinases (ERKs/MAPKs) and cyclin-directed kinases (Cdks) represent two large families of serine-threonine kinases (see Songyang *et al.* (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 6486-6493). Both types of kinases function in cell growth, cell division, and cell differentiation in response to extracellular stimuli. The ERK/MAPK family members are critical participants in intracellular signaling pathways. Upstream activators as well as the ERK/MAPK components are phosphorylated following contact of cells with growth factors or hormones or in response to cellular stressors, for example, heat, ultraviolet light, and inflammatory cytokines. These kinases transport messages that have been relayed from the plasma membrane to the cytoplasm by upstream kinases into the nucleus where they phosphorylate transcription factors and effect gene transcription modulation (Karin *et al.* (1995) *Curr. Biol.* 5: 747-757). Substrates of the ERK/MAPK family include c-fos, c-jun, APF2, and ETS family members Elk1, Sap1a, and c-Ets-1 (cited in Brott *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 963-968).

- [0005] Signal-transduction pathways that employ members of the ERK/MAPK family of serine/threonine kinases are widely conserved among eukaryotes. The multiplicity of these pathways allows the cell to respond to divergent extracellular stimuli by initiating a broad array of responses ranging from cell growth to apoptosis. ERK/MAPK pathways are comprised of a three-tiered core-signaling module wherein ERK/MAPKs are regulated by MAPK/ERK kinases (MEKs), and MEKs, in turn, are regulated by MAPK kinase kinases (MAPKKKs). Mammalian stress-activated ERK/MAPK pathways have been implicated in numerous important physiological functions, including cell growth and proliferation, inflammatory responses, and apoptosis. For example, activation of the ERK1,2 signaling pathway by a mitogenic growth factor, a tumor promoter, or by transformation suppresses decorin gene expression in fibroblasts, which in turn may promote proliferation and migration of normal and malignant cells (Laine *et al.* (2000) *Biochem. J.* 349: 19-25).

[0006] Cdks regulate transitions between successive stages of the cell cycle. The activity of these molecules is controlled by phosphorylation events and by association with cyclin. Cdk activity is negatively regulated by the association of small inhibitory molecules (Dylnacht (1997) *Nature* 389:148-152). Cdk targets include various

WO 03/035840

PCT/US02/34037

transcriptional activators such as p110Rb, p107, and transcription factors, such as p53, E2F, and RNA polymerase II, as well as various cytoskeletal proteins and cytoplasmic signaling proteins (cited in Brott *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 963-968).

- [0007] Protein kinases play critical roles in cellular growth, particularly in the transduction of signals for cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Therefore, novel protein kinase polynucleotides and proteins are useful for modulating cellular growth, differentiation, and/or development.

Summary of the Invention

- [0008] The present invention is based, in part, on the discovery of two novel protein kinase family members, referred to herein as "69583" and "85924". The nucleotide sequence of a cDNA encoding 69583 is shown in SEQ ID NO:1, and the amino acid sequence of a 69583 polypeptide is shown in SEQ ID NO:2. In addition, the nucleotide sequence of the coding region of 69583 is depicted in SEQ ID NO:3. The nucleotide sequence of a cDNA encoding 85924 is shown in SEQ ID NO:4, and the amino acid sequence of a 85924 polypeptide is shown in SEQ ID NO:5. In addition, the nucleotide sequence of the coding region of 85924 is depicted in SEQ ID NO:6.
- [0009] Accordingly, in one aspect, the invention features a nucleic acid molecule which encodes a 69583 or 85924 protein or polypeptide, *e.g.*, a biologically active portion of the 69583 or 85924 protein. In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule encodes a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or 5. In other embodiments, the invention provides isolated 69583 or 85924 nucleic acid molecules having the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6. In still other embodiments, the invention provides nucleic acid molecules that are substantially identical (*e.g.*, naturally occurring allelic variants) to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6. In other embodiments, the invention provides a nucleic acid molecule which hybridizes under a stringent hybridization condition as described herein to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the nucleic acid encodes a full length 69583 or 85924 protein or an active fragment thereof.
- [0010] In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include 69583 or 85924 nucleic acid molecules described herein. In certain embodiments, the nucleic acid molecules of the invention are operatively linked to native

WO 03/035840

PCT/US02/34037

or heterologous regulatory sequences. Also included are vectors and host cells containing the 69583 or 85924 nucleic acid molecules of the invention *e.g.*, vectors and host cells suitable for producing polypeptides.

5 [0011] In another related aspect, the invention provides nucleic acid fragments suitable as primers or hybridization probes for the detection of 69583- or 85924-encoding nucleic acids.

[0012] In still another related aspect, isolated nucleic acid molecules that are antisense to a 69583 or 85924 encoding nucleic acid molecule are provided.

10 [0013] In another aspect, the invention features 69583 or 85924 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 protein kinase-associated or other 69583- or 85924-associated disorders. In another embodiment, the invention provides 69583 and 85924 polypeptides having a 69583 or 85924 activity. Preferred polypeptides are 69583 and 85924 proteins including at least one protein kinase domain, and, preferably, having a 69583 or 85924 activity, *e.g.*, a 69583 or 85924 activity as described herein.

15 [0014] In other embodiments, the invention provides 69583 and 85924 polypeptides, *e.g.*, a 69583 or 85924 polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5; an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5; or an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence which hybridizes under a stringent hybridization condition as described herein to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, wherein the nucleic acid encodes a full length 69583 or 85924 protein or an active fragment thereof.

[0015] In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include 69583 and 85924 nucleic acid molecules described herein.

20 [0016] In a related aspect, the invention provides 69583 and 85924 polypeptides or fragments operatively linked to non-69583 and non-85924 polypeptides to form fusion proteins.

30 [0017] In another aspect, the invention features antibodies and antigen-binding fragments thereof, that react with, or more preferably specifically or selectively bind 69583 or 85924 polypeptides.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[0018] In another aspect, the invention provides methods of screening for compounds that modulate the expression or activity of the 69583 or 85924 polypeptides or nucleic acids.

5 [0019] In still another aspect, the invention provides a process for modulating 69583 or 85924 polypeptide or nucleic acid expression or activity, *e.g.*, using the compounds identified in the screens described herein. In certain embodiments, the methods involve treatment of conditions related to aberrant activity or expression of the 69583 or 85924 polypeptides or nucleic acids, such as conditions or disorders involving aberrant or deficient protein kinase function or expression. Examples of such disorders include, but
10 are not limited to, respiratory disorders, cellular proliferative and/or differentiative disorders, disorders of the lung, disorders of the ovary, disorders of the kidney, disorders of the pancreas, skeletal muscle disorders, colon disorders, breast disorders, brain disorders, disorders of the hypothalamus, disorders of the pituitary, prostate disorders, disorders associated with bone metabolism, immune *e.g.*, inflammatory disorders,
15 cardiovascular disorders, including endothelial cell disorders, liver disorders, viral diseases, pain or metabolic disorders.

[0020] The invention also provides assays for determining the activity of or the presence or absence of 69583 or 85924 polypeptides or nucleic acid molecules in a biological sample, including for disease diagnosis.

20 [0021] In a further aspect, the invention provides assays for determining the presence or absence of a genetic alteration in a 69583 or 85924 polypeptide or nucleic acid molecule, including for disease diagnosis.

[0022] In another aspect, the invention features a two dimensional array having a plurality of addresses, each address of the plurality being positionally distinguishable
25 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 69583 or 85924 molecule. In one embodiment, the capture probe is a nucleic acid, *e.g.*, a probe complementary to a 69583 or 85924 nucleic acid sequence. In another embodiment, the capture probe is a
30 polypeptide, *e.g.*, an antibody specific for 69583 or 85924 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.

[0023] Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Brief Description of the Drawings

[0024] *Figure 1* depicts a hydropathy plot of human 69583. 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 just below the hydropathy trace. The numbers corresponding to the amino acid sequence of human 69583 are indicated. 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 329 to 337, from about 345 to 355, from about 391 to 400, from about 723 to 738 and from about 902 to 920 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 50 to 61, from about 220 to 231, from about 292 to 302, from about 380 to 390, from about 410 to 422, from about 432 to 445, from about 452 to 470, from about 490 to 511, from about 531 to 545, from about 561 to 571, from about 580 to 591, from about 601 to 611, from about 641 to 651, from about 653 to 661, from about 675 to 691, from about 751 to 761, from about 765 to 775, from about 882 to 901 and from about 1002 to 1012 of SEQ ID NO:2; a sequence which includes a Cys, or a glycosylation site.

[0025] *Figure 2* depicts a hydropathy plot of human 85924. 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 just below the hydropathy trace. The numbers corresponding to the amino acid sequence of human 85924 are indicated. 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 361 to 371, from about 721 to 732, from about 761 to 771, from about 821 to 841, from about 970 to 982, from about 1375 to 1390, from about 1431 to 1445, and from about 2124 to 2134 of SEQ ID NO:5; all or part of a hydrophilic sequence, *e.g.*, a sequence below the dashed line, *e.g.*, the sequence from about amino acid 18 to 31, from about 151 to 171, from about 211 to 231, from about 465 to 481, from about 540 to 551, from about 570 to 582, from about 861 to 875, from about 1051 to 1065, from about 1101 to 1121, from about 1200 to 1218, from about 1280 to 1300, from about 1411 to 1425, from about 1591 to 1601, from about 1620 to 1640, from about 1661 to 1671, from about 1740 to 1755, from about 1812 to 1840, from about 1880 to 1891, from about 1911 to 1921, from about 1970 to 1990, from about

WO 03/035840

PCT/US02/34037

2040 to 2052, from about 2080 to 2091 and from about 2170 to 2180 of SEQ ID NO:5; a sequence which includes a Cys, or a glycosylation site.

Detailed Description of the Invention

Human 69583

- 5 [0026] The human 69583 sequence (SEQ ID NO:1), which is approximately 5549 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 3111 nucleotides (nucleotides 1 to 3111 of SEQ ID NO:1; nucleotides 1 to 3111 of SEQ ID NO:3), including the termination codon. The coding sequence encodes a 1036 amino acid protein (SEQ ID NO:2).
- 10 [0027] Human 69583 contains the following regions or other structural features (for general information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix domain identification numbers, refer to Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein* 28:405-420:
- [0028] a Src homology 3 domain, herein referred to as an SH3 domain (PFAM Accession Number PF00018; SEQ ID NO:7) located at about amino acid residues 41 to
- 15 100 of SEQ ID NO:2; a protein kinase domain (PFAM Accession Number PF00069; SEQ ID NO:8) located at about amino acid residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2; twelve protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005) located at about amino acids 58 to 60, 167 to 169, 284 to 286, 299 to 301, 564 to 566, 770 to 772, 808 to 810, 845 to 847, 882 to 884, 932 to 934, 949 to 951 and 1022 to 1024 of SEQ ID NO:2; fifteen casein
- 20 kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006) located at about amino acids 75 to 78, 368 to 371, 399 to 402, 416 to 419, 441 to 444, 455 to 458, 560 to 563, 643 to 646, 688 to 691, 783 to 786, 845 to 848, 893 to 896, 952 to 955, 998 to 1001 and 1026 to 1029 of SEQ ID NO:2; three cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (Prosite PS00004) located at about amino acids 533 to 536, 716 to 719 and 934 to 937 of
- 25 SEQ ID NO:2; three N-glycosylation sites (Prosite PS00001) located at about amino acids 282 to 285, 538 to 541 and 565 to 568 of SEQ ID NO:2; eleven N-myristoylation sites (Prosite PS00008) located at about amino acids 5 to 10, 18 to 23, 33 to 38, 41 to 46, 90 to 95, 145 to 150, 205 to 210, 349 to 354, 355 to 360, 403 to 408 and 784 to 789 of SEQ ID NO:2; two tyrosine kinase phosphorylation sites (Prosite PS00007) located at about
- 30 amino acids 323 to 330 and 716 to 724 of SEQ ID NO:2; one protein kinase ATP-binding region signature (Prosite PS00107) located at about amino acids 130 to 151 of SEQ ID NO:2, and one serine/threonine protein kinases active-site signature (PS00108) located at about amino acids 259 to 271 of SEQ ID NO:2.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Human 85924

- [0029] The human 85924 sequence (SEQ ID NO:4), which is approximately 7825 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 6582 nucleotides (nucleotides 67 to 6648 of SEQ ID NO:4; nucleotides 1 to 6582 of SEQ ID NO:6), including the termination codon. The coding sequence encodes a 2193 amino acid protein (SEQ ID NO:5).
- [0030] Human 85924 contains the following regions or other structural features (for general information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix domain identification numbers, refer to Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein* 28:405-420):
- 10 [0031] a protein kinase domain (PFAM Accession Number PF00069: SEQ ID NO:9) located at about amino acid residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5; thirty four protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005) located at about amino acids 67 to 69, 136 to 138, 154 to 156, 191 to 193, 250 to 252, 268 to 270, 323 to 325, 333 to 335, 517 to 519, 1079 to 1081, 1108 to 1110, 1149 to 1151, 1242 to 1244, 1288 to 1290, 1398 to 15
- 1400, 1482 to 1484, 1547 to 1549, 1582 to 1584, 1622 to 1624, 1661 to 1663, 1697 to 1699, 1832 to 1834, 1876 to 1878, 1882 to 1884, 1913 to 1915, 1937 to 1939, 1948 to 1950, 1980 to 1982, 1984 to 1986, 1988 to 1990, 2018 to 2020, 2066 to 2068, 2085 to 2087 and 2148 to 2150 of SEQ ID NO:5; thirty four casein kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006) located at about amino acids 31 to 34, 35 to 38, 154 to 157, 174 to 177, 20
- 203 to 206, 218 to 221, 492 to 495, 517 to 520, 600 to 603, 625 to 628, 1079 to 1082, 1113 to 1116, 1179 to 1182, 1199 to 1202, 1221 to 1224, 1288 to 1291, 1339 to 1342, 1362 to 1365, 1398 to 1401, 1463 to 1466, 1467 to 1470, 1485 to 1488, 1508 to 1511, 1577 to 1580, 1622 to 1625, 1632 to 1635, 1685 to 1688, 1713 to 1716, 1728 to 1731, 1742 to 1745, 1815 to 1818, 1819 to 1822, 1832 to 1835 and 2053 to 2056 of SEQ ID
- 25 NO:5; eight cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (Prosite PS00004) located at about amino acids 215 to 218, 335 to 338, 393 to 396, 456 to 459, 1106 to 1109, 1771 to 1774, 1879 to 1882 and 2050 to 2053 of SEQ ID NO:5; two N-glycosylation sites (Prosite PS00001) located at about amino acids 1817 to 1820 and 2045 to 2048 of SEQ ID NO:5; twenty six N-myristoylation sites (Prosite PS00008) located at
- 30 about amino acids 6 to 11, 42 to 47, 143 to 148, 190 to 195, 267 to 272, 398 to 403, 605 to 610, 746 to 751, 800 to 805, 1064 to 1069, 1074 to 1079, 1089 to 1094, 1204 to 1209, 1218 to 1223, 1332 to 1337, 1355 to 1360, 1386 to 1391, 1533 to 1538, 1573 to 1578, 1626 to 1631, 1642 to 1647, 1763 to 1768, 1966 to 1971, 2132 to 2137, 2144 to 2149 and 2175 to 2180 of SEQ ID NO:5; two tyrosine kinase phosphorylation sites (Prosite

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- PS00007) located at about amino acids 422 to 428 and 1849 to 1856 of SEQ ID NO:5; one glycosaminoglycan attachment site (Prosite PS00002) located at about amino acids 604 to 607 of SEQ ID NO:5, four amidation sites (Prosite PS00009) located at about amino acids 252 to 255, 454 to 457, 1242 to 1245 and 1876 to 1879 of SEQ ID NO:5, one
- 5 RGD cell attachment sequence (Prosite PS00016) located at about amino acids 1523 to 1525 of SEQ ID NO:5, one leucine zipper pattern (Prosite PS00029) located at about amino acids 774 to 795 of SEQ ID NO:5 and one serine/threonine protein kinases active-site signature (PS00108) located at about amino acids 305 to 317 of SEQ ID NO:5.

10 **Table 1: Summary of Sequence Information for 69583 and 85924**

Gene	cDNA	ORF	Polypeptide
69583	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:2
85924	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:5

Table 2: Summary of Domains of 69583 and 85924

Gene	Protein Kinase	SH3
69583	About amino acids 124 to 398 of SEQ ID NO:2	About Amino Acids 41 to 100 of SEQ ID NO:2
86414	About amino acids 181 to 439 of SEQ ID NO:5	

- [0032]** The 69583 and 85924 proteins contain a significant number of structural
- 15 characteristics in common with members of the protein kinase family. The term "family" when referring to the proteins 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
- 20 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 homologs of non-human origin, *e.g.*, rat or mouse proteins. Members of a family also can have common functional characteristics.
- [0033]** As used herein, the term "protein kinase" includes a protein or polypeptide
- 25 which is capable of modulating its own phosphorylation state or the phosphorylation state of another molecule, *e.g.*, protein or polypeptide. Protein kinases can have a specificity

WO 03/035840

PCT/US02/34037

for (i.e., a specificity to phosphorylate) serine/threonine residues, tyrosine residues, or both serine/threonine and tyrosine residues, e.g., the dual specificity kinases.

[0034] Eukaryotic protein kinases make up a large family of homologous proteins.

They are all related by the presence of their kinase domains and can be further sub-
 5 catagorized, according to their substrate specificity, into serine/threonine protein kinases
 and/or tyrosine protein kinases. Both types of protein kinases have similar catalytic
 domains, although certain signature sites have been identified which can help to
 determine if a protein kinase will phosphorylate serine/threonine residues or tyrosine
 10 residues. The protein kinase domains of 69583 and 85924 contain such signature
 sequences specific to serine/threonine as well as tyrosine, thereby suggesting that 69583
 and 85924 polypeptides may phosphorylate serine, threonine and/or tyrosine residues,
 i.e., they are likely to be dual specificity kinases.

[0035] Members of a protein kinase family of proteins are characterized by a
 conserved catalytic region, which has been further subdivided into eleven major
 15 conserved subdomains. Such subdomains may participate in the catalytic function of the
 protein kinase by being components of the active site or by indirectly contributing to the
 creation of the active site. Highly conserved residues have also been identified in each of
 the eleven subdomains, many of which directly participate in ATP binding and phospho-
 transfer. Members of the protein kinase family of proteins typically contain a glycine-rich
 20 region in subdomain I. The best characterized conserved residue present in members of
 the protein kinase family is a lysine residue which is usually located in subdomain II
 (Hanks et al., (1988) Science 241:42-52). This lysine residue has been shown to be
 involved in ATP binding. The protein kinase domain of 85924 has a lysine residue in its
 subdomain I, which substitutes for the catalytic lysine that is lacking in its subdomain II.
 25 This characteristic indicates that 85924 belongs to a novel class of serine/threonine
 protein kinases, of which the WNK1 protein kinase is a member (*Xu et al. (2000) Journal
 of Biological Chemistry 275:16795-16801*). Members of the protein kinase family of
 proteins usually have a conserved aspartic acid residue located within the central core of
 the catalytic domain, usually within subdomain VI, which is important for the catalytic
 30 activity of the serine/threonine kinase subfamily of proteins.

[0036] A 69583 or 85924 polypeptide can include a "protein kinase domain" or
 regions homologous with a "protein kinase domain". A 69583 polypeptide can further
 include a "SH3 domain" or regions homologous with a "SH3 domain".

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [0037] As used herein, the term "protein kinase domain" includes an amino acid sequence of about 250 to 275 amino acid residues in length and having a bit score for the alignment of the sequence to the protein kinase domain (HMM) of at least 200. Preferably a protein kinase domain mediates phosphorylation by binding ATP. Preferably,
- 5 a protein kinase domain includes at least about 200 to 325 amino acids, more preferably about 225 to 300 amino acid residues, or about 250 to 275 amino acids and has a bit score for the alignment of the sequence to the protein kinase domain (HMM) of at least 100, 125, 150, 175, 200 or greater. The protein kinase domain consensus sequence (HMM) has been assigned the PFAM Accession Number PF00069 (Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein*
- 10 28:405-420, SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:9). An alignment of the protein kinase domain (amino acids 124 to 398 of SEQ ID NO:2) of human 69583 with the Pfam protein kinase domain consensus amino acid sequence derived from a hidden Markov model yielded a bit score of 302.9. An alignment of the protein kinase domain (amino acids 181 to 439 of SEQ ID NO:5) of human 85924 with the Pfam protein kinase domain consensus
- 15 amino acid sequence derived from a hidden Markov model yielded a bit score of 206.5.
- [0038] The 69583 and 85924 polypeptides contain a protein kinase domain. Members of the protein kinase family are related by virtue of this domain (also referred to as a "catalytic" domain) which consists of approximately 250-300 amino acid residues. The protein kinase domain of the 69583 polypeptide contains a glycine rich region from about
- 20 amino acid residues 130 to 151 of SEQ ID NO:2 which are adjacent to a conserved lysine located at about amino acid residue 151 of SEQ ID NO:2. This conserved lysine is part of a protein kinase ATP-binding region signature. The conserved signature pattern is as follows: [LIV]-G-(P)-G-(P)-[FYWMGSTNH]-[SGA]-[PW]-[LIVCAT]-[PD]-x-[GSTACLIVMFY]-x(5,18)-[LIVMFYWCSTAR]-[AIVP]-[LIVMFAGCKR]-K, where
- 25 the "K" is an active site residue (SEQ ID NO:10). 69583 and 85924 polypeptides also contain tyrosine residues at about amino acid 330 of SEQ ID NO:2 and at about amino acids 428 and 1856 of SEQ ID NO:5, respectively. This tyrosine is part of a tyrosine kinase phosphorylation site signature. The conserved signature pattern is as follows: [RK]-x(2)-[DE]-x(3)-Y or [RK]-x(3)-[DE]-x(2)-Y, where "Y" is the phosphorylation site
- 30 (SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12). Both 69583 and 85924 polypeptides also contain a conserved aspartic acid at about amino acid 263 of SEQ ID NO:2 and at about amino acid 309 of SEQ ID NO:5, respectively. This aspartic acid is part of a serine/threonine protein kinases active-site signature that is specific to most serine/threonine specific kinases. The

WO 03/035840

PCT/US02/34037

conserved signature pattern is as follows: [LIVMFYC]-x-[HY]-x-D-[LIVMFY]-K-x(2)-N-[LIVMFYCT](3), where the "D" is an active site residue (SEQ ID NO:13).

- [0039]** In the above conserved signature sequences, and other motifs or signature sequences described herein, the standard IUPAC one-letter code for the amino acids is used. Each element in the pattern is separated by a dash (-); square brackets ([]) indicate the particular residues that are accepted at that position; x indicates that any residue is accepted at that position; braces ({ }) indicate the particular residues that are not accepted at that position; and numbers in parentheses () indicate the number of residues represented by the accompanying amino acid.
- 10 **[0040]** In a preferred embodiment, a 69583 or 85924 polypeptide or protein has a "protein kinase domain" or a region which includes at least about 200 to 325 more preferably about 225 to 300 or 250 to 275 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with a "protein kinase domain," *e.g.*, the protein kinase domain of human 69583 or 85924 (*e.g.*, residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 and residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5).
- 15 **[0041]** To identify the presence of a "protein kinase" domain in a 69583 or 85924 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 searched against the Pfam database of HMMs (*e.g.*, the Pfam database, release 2.1) using the default
- 20 parameters. For example, the hmmsf program, which is available as part of the HMMER package of search programs, is a family specific default program for MILPAT0063 and a score of 15 is the default threshold score for determining a hit. Alternatively, the threshold score for determining a hit can be lowered (*e.g.*, to 8 bits). A description of the Pfam database can be found in Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28:405-420 and a
- 25 detailed description of HMMs can be found, for example, in Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; and Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314, the contents of which are incorporated herein by reference. A search was performed against the HMM database resulting in the identification of a "protein kinase"
- 30 domain in the amino acid sequences of human 69583 and 85924 at about residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 and at about residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5, respectively).
- [0042]** As used herein, the term "SH3 domain" includes an amino acid sequence of about 59 amino acid residues in length and having a bit score for the alignment of the sequence to the SH3 domain (HMM) of at least 57.4. Preferably a SH3 domain is

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- involved in signal transduction related to cytoskeletal organization. Preferably, a SH3 domain includes at least about 30 to 80 amino acids, more preferably about 40 to 70 amino acid residues, or about 50 to 60 amino acids and has a bit score for the alignment of the sequence to the protein kinase domain (HMM) of at least 20, 30, 40, 50, 57 or greater. The SH3 domain consensus sequence (HMM) has been assigned the PFAM Accession Number PF00018 (Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein* 28:405-420; SEQ ID NO:7). An alignment of the SH3 domain (amino acids 41 to 100 of SEQ ID NO:2) of human 69583 with the Pfam SH3 domain consensus amino acid sequence derived from a hidden Markov model yielded a bit score of 57.4.
- 10 [0043] In a preferred embodiment, a 69583 polypeptide or protein has a "SH3 domain" or a region which includes at least about 30 to 80 more preferably about 40 to 70 or 50 to 60 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with a "SH3 domain," *e.g.*, the SH3 domain of human 69583 (*e.g.*, residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2).
- 15 [0044] To identify the presence of a "SH3" domain in a 69583 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 searched against the Pfam database of HMMs (*e.g.*, the Pfam database, release 2.1) using the default parameters. For example, the hmmsf program, which is available as part of the HMMER package of search
- 20 programs, is a family specific default program for MILPAT0063 and a score of 15 is the default threshold score for determining a hit. Alternatively, the threshold score for determining a hit can be lowered (*e.g.*, to 8 bits). A description of the Pfam database can be found in Sonnhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28:405-420 and a detailed description of HMMs can be found, for example, in Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159;
- 25 Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; and Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314, the contents of which are incorporated herein by reference. A search was performed against the HMM database resulting in the identification of a "SH3" domain in the amino acid sequences of human 69583 at about residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2.
- 30 [0045] A human 69583 protein can further include a coiled coil structure. Coiled coil structures are supercoiled helical domains responsible for the oligomerization of proteins. There is a characteristic heptad repeat (h-x-x-h-x-x-x) in the coiled coil structures, where h represents hydrophobic residues (Beck and Brodsky (1998) *J. Struct. Biol.* 122:17-29). Coiled coil structures are found in a wide variety of proteins, including cytoskeletal,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

nuclear, muscle, cell surface, extracellular, plasma, bacterial, and viral proteins and can be found in the 69583 polypeptide at about amino acids 418 to 489 of SEQ ID NO:2.

- [0046]** A 85924 protein kinase can further include a leucine zipper motif, or regions homologous with a leucine zipper motif (Prosite PS00029). Leucine zippers typically contain a repeat of at least two, three, four, five, preferably six leucine residues positioned every seven amino acids over a distance of eight helical turns. The segments containing these periodic arrays of leucines appear to exist in an alpha-helical conformation in which leucine side chains extending from one alpha-helix interact with those from a similar alpha helix of a second polypeptide, facilitating dimerization. The leucine zipper pattern is present in many gene regulatory proteins, such as CCATT-box and enhancer binding protein (C/EBP), cAMP response element (CRE) binding proteins (CREB, CRE-BP1, ATFs), jun/AP1 family transcription factors, C-myc, L-myc and N-myc oncogenes and octamer-binding transcription factor 2 (Oct-2/OTF-2). These interactions are frequently required for the activity of the protein complex, e.g., transcriptional activation of a nucleic acid via binding to a gene regulatory sequence and subsequent formation of a transcription initiation complex. Leucine zippers therefore mediate protein-protein interactions *in vivo* and in particular, interactions between multi-subunit transcription factors (homodimers, heterodimers, etc.). The leucine zipper in the 85924 protein kinase can be found at about amino acids 774 to 795 of SEQ ID NO:5.
- [0047]** The 85924 protein can have at least one predicted RGD cell attachment sequence. As used herein, the term "RGD cell attachment sequence" refers to a cell adhesion sequence consisting of amino acid residues Arg-Gly-Asp found in extracellular matrix proteins and intracellular trafficking proteins (reviewed in Ruoslahti, E. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:697-715). An RGD sequence in a protein can mediate cell attachment through protein-protein interaction or can mediate interactions between proteins in cells or vesicles. The RGD cell attachment sequence of human 85924 can be found at about amino acids 1523 to 1525 of SEQ ID NO:5.
- [0048]** A 69583 family member can include at least one protein kinase domain; and at least one SH3 domain. Furthermore, a 69583 family member can include at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, preferably twelve protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005); at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, preferably fifteen casein kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006); at least one, two, preferably three N-glycosylation sites (Prosite PS00001); at least one, two, preferably three cAMP/cGMP

WO 03/035840

PCT/US02/34037

protein kinase phosphorylation sites (Prosite PS00004); at least one, preferably two tyrosine kinase phosphorylation sites (Prosite PS00007); and at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, preferably eleven N-myristoylation sites (Prosite PS00008).

- 5 [0049] A 85924 family member can include at least one protein kinase domain. Furthermore, a 85924 family member can include at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, eighteen, nineteen, twenty, twenty one, twenty two, twenty three, twenty four, twenty five, twenty six, twenty seven, twenty eight, twenty nine, thirty, thirty one, thirty two, 10 thirty three, preferably thirty four protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005); at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, eighteen, nineteen, twenty, twenty one, twenty two, twenty three, twenty four, twenty five, twenty six, twenty seven, twenty eight, twenty nine, thirty, thirty one, thirty two, thirty three, preferably thirty four casein 15 kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006); at least one, preferably two N-glycosylation sites (Prosite PS00001); at least one, two, three, four, five, six, seven, preferably eight cAMP/cGMP protein kinase phosphorylation sites (Prosite PS00004); at least one glycosaminoglycan attachment site (Prosite PS00002); at least one, two, three, preferably four amidation sites (Prosite PS00009); at least one, preferably two tyrosine 20 kinase phosphorylation sites (Prosite PS00007); and at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, eighteen, nineteen, twenty, twenty one, twenty two, twenty three, twenty four, twenty five, preferably twenty six N-myristoylation sites (Prosite PS00008).

- [0050] As the 69583 or 85924 polypeptides of the invention can modulate 69583- or 25 85924-mediated activities, they can be useful for developing novel diagnostic and therapeutic agents for protein kinase-associated or other 69583- or 85924-associated disorders, as described below.

- [0051] As used herein, a "69583 or 85924 activity", "biological activity of 69583 or 85924" or "functional activity of 69583 or 85924", refers to an activity exerted by a 30 69583 or 85924 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on *e.g.*, a 69583- or 85924-responsive cell or on a 69583 or 85924 substrate, *e.g.*, a protein substrate, as determined *in vivo* or *in vitro*. In one embodiment, a 69583 or 85924 activity is a direct activity, such as an association with a 69583 or 85924 target molecule. A "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a 69583 or 85924 protein binds or interacts in nature. In

WO 03/035840

PCT/US02/34037

an exemplary embodiment, 69583 or 85924 are protein kinases and thus bind to or interact in nature with an ATP molecule.

[0052] A 69583 or 85924 activity can also be an indirect activity, *e.g.*, a cellular signaling activity mediated by interaction of the 69583 or 85924 protein with a 69583 or 85924 receptor. Based on the above-described sequence structures and similarities to molecules of known function, the 69583 or 85924 molecules of the present invention can have similar biological activities as protein kinase family members. For example, the 69583 or 85924 proteins of the present invention can have one or more of the following activities: 1) the ability to regulate transmission of signals from cellular receptors, *e.g.*, cell growth factor receptors; 2) the ability to modulate the entry of cells, *e.g.*, precursor cells, into mitosis; 3) the ability to modulate cellular differentiation; 4) the ability to modulate cell death; 5) the ability to regulate cytoskeleton function, *e.g.*, actin bundling; 6) the ability to bind a molecule, *e.g.* a nucleotide (*e.g.* adenosine triphosphate); 7) the ability to phosphorylate a substrate molecule, *e.g.* at a serine, threonine and/or tyrosine residue; and 8) the ability to act as a substrate for phosphorylation, *e.g.*, at a serine/threonine or tyrosine residue. Therefore, the molecules of the invention can be used as therapeutics or drug targets in the development of therapeutics for protein kinase disorders. As used herein, "protein kinase disorders" are diseases or disorders whose pathogenesis is caused by, is related to, or is associated with aberrant or deficient protein kinase function or expression.

[0053] The 69583 or 85924 molecules of the invention can modulate the activities of cells in tissues where they are expressed. For example, 69583 mRNA is expressed in lung tumors, in ovarian tumors, in colon tumors, in breast tumors, in kidney and in pancreas. Accordingly, the 69583 molecules of the invention can act as therapeutic or diagnostic agents for lung, ovarian, renal, pancreatic, colon and breast disorders. Additionally, 85924 mRNA is expressed in pancreas, in skeletal muscle, in brain cortex, in hypothalamus, in pituitary glands, in prostate tumors, in lung tumors and in congestive heart failure samples. Accordingly, the 85924 molecules of the invention can act as therapeutic or diagnostic agents for pancreatic, skeletal muscle, brain, hypothalamic, pituitary, prostate, lung and cardiovascular disorders.

[0054] Examples of disorders of the lung include, but are not limited to, congenital anomalies; atelectasis; diseases of vascular origin, such as pulmonary congestion and edema, including hemodynamic pulmonary edema and edema caused by microvascular injury, adult respiratory distress syndrome (diffuse alveolar damage), pulmonary

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- embolism, hemorrhage, and infarction, and pulmonary hypertension and vascular sclerosis; chronic obstructive pulmonary disease, such as emphysema, chronic bronchitis, bronchial asthma, and bronchiectasis; diffuse interstitial (infiltrative, restrictive) diseases, such as pneumoconioses, sarcoidosis, idiopathic pulmonary fibrosis, desquamative interstitial pneumonitis, hypersensitivity pneumonitis, pulmonary eosinophilia
- 5 (pulmonary infiltration with eosinophilia), *Bronchiolitis obliterans*-organizing pneumonia, diffuse pulmonary hemorrhage syndromes, including Goodpasture syndrome, idiopathic pulmonary hemosiderosis and other hemorrhagic syndromes, pulmonary involvement in collagen vascular disorders, and pulmonary alveolar proteinosis;
- 10 complications of therapies, such as drug-induced lung disease, radiation-induced lung disease, and lung transplantation; tumors, such as bronchogenic carcinoma, including paraneoplastic syndromes, bronchioloalveolar carcinoma, neuroendocrine tumors, such as bronchial carcinoid, miscellaneous tumors, and metastatic tumors; pathologies of the pleura, including inflammatory pleural effusions, noninflammatory pleural effusions,
- 15 pneumothorax, and pleural tumors, including solitary fibrous tumors (pleural fibroma) and malignant mesothelioma.

[0055] The 69583 or 85924 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of ovarian disorders. Disorders involving the ovary include, for example, polycystic ovarian disease, Stein-leventhal syndrome,

- 20 Pseudomyxoma peritonei and stromal hyperthecosis; ovarian tumors such as, tumors of coelomic epithelium, serous tumors, mucinous tumors, endometrioid tumors, clear cell adenocarcinoma, cystadenofibroma, brenner tumor, surface epithelial tumors; germ cell tumors such as mature (benign) teratomas, monodermal teratomas, immature malignant teratomas, dysgerminoma, endodermal sinus tumor, choriocarcinoma; sex cord-stomal
- 25 tumors such as, granulosa-theca cell tumors, thecoma-fibromas, androblastomas, hill cell tumors, and gonadoblastoma; and metastatic tumors such as Krukenberg tumors.

- [0056] The 69583 or 85924 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of renal disorders. Examples of renal disorders or diseases include, but are not limited to, congenital anomalies including, but not limited to, cystic
- 30 diseases of the kidney, that include but are not limited to, cystic renal dysplasia, autosomal dominant (adult) polycystic kidney disease, autosomal recessive (childhood) polycystic kidney disease, and cystic diseases of renal medulla, which include, but are not limited to, medullary sponge kidney, and nephronophthisis-uremic medullary cystic disease complex, acquired (dialysis-associated) cystic disease, such as simple cysts; glomerular diseases

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- including pathologies of glomerular injury that include, but are not limited to, in situ immune complex deposition, that includes, but is not limited to, anti-GBM nephritis, Heymann nephritis, and antibodies against planted antigens, circulating immune complex nephritis, antibodies to glomerular cells, cell-mediated immunity in glomerulonephritis,
- 5 activation of alternative complement pathway, epithelial cell injury, and pathologies involving mediators of glomerular injury including cellular and soluble mediators, acute glomerulonephritis, such as acute proliferative (poststreptococcal, postinfectious) glomerulonephritis, including but not limited to, poststreptococcal glomerulonephritis and nonstreptococcal acute glomerulonephritis, rapidly progressive (crescentic)
- 10 glomerulonephritis, nephrotic syndrome, membranous glomerulonephritis (membranous nephropathy), minimal change disease (lipoid nephrosis), focal segmental glomerulosclerosis, membranoproliferative glomerulonephritis, IgA nephropathy (Berger disease), focal proliferative and necrotizing glomerulonephritis (focal glomerulonephritis), hereditary nephritis, including but not limited to, Alport syndrome and thin membrane
- 15 disease (benign familial hematuria), chronic glomerulonephritis, glomerular lesions associated with systemic disease, including but not limited to, systemic lupus erythematosus, Henoch-Schönlein purpura, bacterial endocarditis, diabetic glomerulosclerosis, amyloidosis, fibrillary and immunotactoid glomerulonephritis, and other systemic disorders; diseases affecting tubules and interstitium, including acute tubular
- 20 necrosis and tubulointerstitial nephritis, including but not limited to, pyelonephritis and urinary tract infection, acute pyelonephritis, chronic pyelonephritis and reflux nephropathy, and tubulointerstitial nephritis induced by drugs and toxins, including but not limited to, acute drug-induced interstitial nephritis, analgesic abuse nephropathy, nephropathy associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and other tubulointerstitial diseases
- 25 including, but not limited to, urate nephropathy, hypercalcemia and nephrocalcinosis, and multiple myeloma; diseases of blood vessels including benign nephrosclerosis, malignant hypertension and accelerated nephrosclerosis, renal artery stenosis, and thrombotic microangiopathies including, but not limited to, classic (childhood) hemolytic-uremic syndrome, adult hemolytic-uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura,
- 30 idiopathic HUS/TTP, and other vascular disorders including, but not limited to, atherosclerotic ischemic renal disease, atheroembolic renal disease, sickle cell disease nephropathy, diffuse cortical necrosis, and renal infarcts; urinary tract obstruction (obstructive uropathy); urolithiasis (renal calculi, stones); and tumors of the kidney including, but not limited to, benign tumors, such as renal papillary adenoma, renal fibroma

WO 03/035840

PCT/US02/34037

or hamartoma (renomedullary interstitial cell tumor), angiomyolipoma, and oncocytoma, and malignant tumors, including renal cell carcinoma (hypernephroma, adenocarcinoma of kidney), which includes urothelial carcinomas of renal pelvis.

- [0057] The 69583 or 85924 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of pancreatic disorders. Disorders involving the pancreas include those of the exocrine pancreas such as congenital anomalies, including but not limited to, ectopic pancreas; pancreatitis, including but not limited to, acute pancreatitis; cysts, including but not limited to, pseudocysts; tumors, including but not limited to, cystic tumors and carcinoma of the pancreas; and disorders of the endocrine pancreas such as, diabetes mellitus; islet cell tumors, including but not limited to, insulinomas, gastrinomas, and other rare islet cell tumors.
- [0058] The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of colon disorders. Disorders involving the colon include, but are not limited to, congenital anomalies, such as atresia and stenosis, Meckel diverticulum, congenital aganglionic megacolon-Hirschsprung disease; enterocolitis, such as diarrhea and dysentery, infectious enterocolitis, including viral gastroenteritis, bacterial enterocolitis, necrotizing enterocolitis, antibiotic-associated colitis (pseudomembranous colitis), and collagenous and lymphocytic colitis, miscellaneous intestinal inflammatory disorders, including parasites and protozoa, acquired immunodeficiency syndrome, transplantation, drug-induced intestinal injury, radiation enterocolitis, neutropenic colitis (typhlitis), and diversion colitis; idiopathic inflammatory bowel disease, such as Crohn disease and ulcerative colitis; tumors of the colon, such as non-neoplastic polyps, adenomas, familial syndromes, colorectal carcinogenesis, colorectal carcinoma, and carcinoid tumors.
- [0059] The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of breast disorders. Disorders of the breast include, but are not limited to, disorders of development; inflammations, including but not limited to, acute mastitis, periductal mastitis, periductal mastitis (recurrent subareolar abscess, squamous metaplasia of lactiferous ducts), mammary duct ectasia, fat necrosis, granulomatous mastitis, and pathologies associated with silicone breast implants; fibrocystic changes; proliferative breast disease including, but not limited to, epithelial hyperplasia, sclerosing adenosis, and small duct papillomas; tumors including, but not limited to, stromal tumors such as fibroadenoma, phyllodes tumor, and sarcomas, and epithelial tumors such as large duct papilloma; carcinoma of the breast including in situ

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- (noninvasive) carcinoma that includes ductal carcinoma in situ (including Paget's disease) and lobular carcinoma in situ, and invasive (infiltrating) carcinoma including, but not limited to, invasive ductal carcinoma, no special type, invasive lobular carcinoma, medullary carcinoma, colloid (mucinous) carcinoma, tubular carcinoma, and invasive
- 5 papillary carcinoma, and miscellaneous malignant neoplasms. Disorders in the male breast include, but are not limited to, gynecomastia and carcinoma.
- [0060]** The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of skeletal muscle disorders, such as muscular dystrophy (e.g., Duchenne muscular dystrophy, Becker muscular dystrophy, Emery-Dreifuss muscular
- 10 dystrophy, limb-girdle muscular dystrophy, facioscapulohumeral muscular dystrophy, myotonic dystrophy, oculopharyngeal muscular dystrophy, distal muscular dystrophy, and congenital muscular dystrophy), motor neuron diseases (e.g., amyotrophic lateral sclerosis, infantile progressive spinal muscular atrophy, intermediate spinal muscular atrophy, spinal bulbar muscular atrophy, and adult spinal muscular atrophy), myopathies (e.g., inflammatory
- 15 myopathies (e.g., dermatomyositis and polymyositis), myotonia congenita, paramyotonia congenita, central core disease, nemaline myopathy, myotubular myopathy, and periodic paralysis), and metabolic diseases of muscle (e.g., phosphorylase deficiency, acid maltase deficiency, phosphofructokinase deficiency, debrancher enzyme deficiency, mitochondrial myopathy, carnitine deficiency, carnitine palmityl transferase deficiency, phosphoglycerate
- 20 kinase deficiency, phosphoglycerate mutase deficiency, lactate dehydrogenase deficiency, and myoadenylate deaminase deficiency). Disorders involving the skeletal muscle additionally include tumors such as rhabdomyosarcoma.
- [0061]** The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of brain disorders. Disorders involving the brain include,
- 25 but are not limited to, 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
- 30 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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
- 5 meningoencephalitis, including tuberculosis and mycobacterioses, neurosyphilis, and neuroborreliosis (Lyme disease), viral meningoencephalitis, 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 meningoencephalitis (subacute encephalitis),
- 10 vacuolar myelopathy, AIDS-associated myopathy, peripheral neuropathy, and AIDS in children, progressive multifocal leukoencephalopathy, subacute sclerosing panencephalitis, fungal meningoencephalitis, other infectious diseases of the nervous system; transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases); demyelinating diseases, including multiple sclerosis, multiple sclerosis variants, acute disseminated
- 15 encephalomyelitis and acute necrotizing hemorrhagic encephalomyelitis, and other diseases with demyelination; degenerative diseases, such as degenerative diseases affecting the cerebral cortex, including Alzheimer disease and Pick disease, degenerative diseases of basal ganglia and brain stem, including Parkinsonism, idiopathic Parkinson disease (paralysis agitans), progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration,
- 20 multiple system atrophy, including striatonigral degeneration, Shy-Drager syndrome, and olivopontocerebellar atrophy, and Huntington 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
- 25 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
- 30 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,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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,
- 5 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.
- 10 **[0062]** The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of hypothalamic disorders. Hypothalamic dysfunction occurs only when disease is bilateral. Tumors in the region of the hypothalamus (e.g., craniopharyngiomas, gliomas of the optic nerve, sphenoid ridge meningiomas, germinomas, tuberculum sellae meningiomas, hematomas, ependymomas, teratomas) are
- 15 often low growing and may achieve large size before symptoms appear. Large tumors may affect frontal or temporal lobe function. The hypothalamus is responsible for food intake and feeding behavior, temperature regulation, sleep wake cycle, memory and behavior, thirst and autonomic nervous system function. Therefore, hypothalamic disorders include body weight disorders (e.g., anorexia, obesity and/or hyperphagia),
- 20 eating disorders (e.g., anorexia nervosa and/or bulimia nervosa, hyperglycemia and/or hypoglycemia), temperature regulation disorders (e.g., hypothermia, poikilothermia), sleeping disorders (e.g., insomnia, hypersomnolence, coma), memory and behavioral disorders (e.g., memory loss, dementia), autosomal nervous system disorders (e.g., hypotension, bradycardia, electrocardiographic abnormalities, myocardial necrosis,
- 25 diencephalic epilepsy), cachexia, AIDS-related wasting and cancer-related wasting.
- [0063]** The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of pituitary disorders. The pituitary secretes such hormones as thyroid stimulating hormone (TSH), follicle stimulating hormone (FSH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and others. It controls the activity of many other
- 30 endocrine glands (thyroid, ovaries, adrenal, etc.). Pituitary related disorders include, among others, pituitary adenomas, which may result in visual field defects, oculomotor palsies or acute hemorrhagic infarction, incidentalomas, prolactinomas, acromegaly, Cushing's syndrome, craniopharyngiomas, Empty Sella syndrome, hypogonadism,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

hypopituitarism, and hypophysitis, in addition to disorders of the endocrine glands that the pituitary controls.

- [0064] The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of prostate disorders. As used herein, "a prostate disorder" refers to an abnormal condition occurring in the male pelvic region characterized by, e.g., male sexual dysfunction and/or urinary symptoms. This disorder may be manifested in the form of genitourinary inflammation (e.g., inflammation of smooth muscle cells) as in several common diseases of the prostate including prostatitis, benign prostatic hyperplasia and cancer, e.g., adenocarcinoma or carcinoma, of the prostate.
- [0065] The 69583 and 85924 nucleic acid and proteins of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of cardiovascular disorders. As used herein, disorders involving the heart, or "cardiovascular disease" or a "cardiovascular disorder" includes a disease or disorder which affects the cardiovascular system, e.g., the heart, the blood vessels, and/or the blood. A cardiovascular disorder can be caused by an imbalance in arterial pressure, a malfunction of the heart, or an occlusion of a blood vessel, e.g., by a thrombus. A cardiovascular disorder includes, but is not limited to disorders such as arteriosclerosis, atherosclerosis, cardiac hypertrophy, ischemia reperfusion injury, restenosis, arterial inflammation, vascular wall remodeling, ventricular remodeling, rapid ventricular pacing, coronary microembolism, tachycardia, bradycardia, pressure overload, aortic bending, coronary artery ligation, vascular heart disease, valvular disease, including but not limited to, valvular degeneration caused by calcification, rheumatic heart disease, endocarditis, or complications of artificial valves; atrial fibrillation, long-QT syndrome, congestive heart failure, sinus node dysfunction, angina, heart failure, hypertension, atrial fibrillation, atrial flutter, pericardial disease, including but not limited to, pericardial effusion and pericarditis; cardiomyopathies, e.g., dilated cardiomyopathy or idiopathic cardiomyopathy, myocardial infarction, coronary artery disease, coronary artery spasm, ischemic disease, arrhythmia, sudden cardiac death, and cardiovascular developmental disorders (e.g., arteriovenous malformations, arteriovenous fistulae, raynaud's syndrome, neurogenic thoracic outlet syndrome, causalgia/reflex sympathetic dystrophy, hemangioma, aneurysm, cavernous angioma, aortic valve stenosis, atrial septal defects, atrioventricular canal, coarctation of the aorta, ebsteins anomaly, hypoplastic left heart syndrome, interruption of the aortic arch, mitral valve prolapse, ductus arteriosus, patent foramen ovale, partial anomalous pulmonary venous return, pulmonary atresia with ventricular septal defect, pulmonary atresia without ventricular septal defect, persistence

WO 03/035840

PCT/US02/34037

of the fetal circulation, pulmonary valve stenosis, single ventricle, total anomalous pulmonary venous return, transposition of the great vessels, tricuspid atresia, truncus arteriosus, ventricular septal defects). A cardiovascular disease or disorder also can include an endothelial cell disorder.

- 5 [0066] Asthma is an inflammatory disease of the airways. Airway hyper-responsiveness and excess smooth muscle mass coexist in patients with asthma and bronchopulmonary dysplasia. Kinase pathways (i.e. protein kinase C of lymphocytes) can also lead to elaboration of inflammatory mediators, which are likely to initiate and perpetuate the asthmatic response. During activation of lymphocytes, the role of protein
10 kinases has been emphasized. Changes in kinase activity in peripheral blood lymphocytes in bronchial asthma may be due to alterations in the regulatory mechanisms of the enzyme molecule.

- [0067] More specifically, serine/threonine kinases of the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) superfamily, which upon activation, translocate from the cytoplasm
15 to the nucleus after mitogenic stimulation, and initiate transcription. Mitogenic signaling via serine/threonine kinases therefor stimulates smooth muscle proliferation, which may increase bronchoconstrictor-induced airway narrowing. Hershenson MB, *et.al.* (1997) *Can J Physiol Pharmacol* 75(7):898-910.

- [0068] Protein kinase-associated activities are moderated by chemokines, which are
20 important mediators of inflammation. Animal studies suggest that inhibition of chemokine action upon protein kinases results in a decrease in inflammation. The potential role of chemokine activity on protein kinase pathways in various disease manifestations, includes: adult respiratory distress syndrome, atherosclerosis, inflammatory bowel disease, and solid organ rejection. (Shames BD *et.al.* (2000) *Shock*
25 Jul;14(1):1-7). Protein kinase family members are found in T cells, B cells and mast cells, and they are also regulated in the mouse model of allergenic airway disease (AAD).

- [0069] Accordingly, the 69583 or 85924 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of immune, *e.g.*, inflammatory, (*e.g.* respiratory inflammatory) disorders. Examples of immune disorders or diseases include, but are not
30 limited to, autoimmune 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.*

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- Crohn's disease and ulcerative colitis, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, asthma, allergic asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic
- 5 encephalomyelitis, acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polychondritis, 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
- 10 disease, cases of transplantation, and allergy such as, atopic allergy.
- [0070]** Protein kinases may also play a critical role in processes relevant to neoplastic transformation and tumor invasion. This renders protein kinases as potentially suitable targets for anticancer therapy. Blocking of protein kinase activity in human lung carcinoma LTPa-2 cells markedly inhibits the cell proliferation rate, colony forming
- 15 efficiency in soft agar, tumorigenicity in nude mice, and the neoplastic properties of these tumor cells. (Wang XY *et.al.* (1999) *Exp Cell Res* Jul 10;250(1):253-63). Accordingly, the 69583 or 85924 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat cellular proliferative and/or differentiative disorders.
- [0071]** Examples of cellular proliferative and/or differentiative disorders include
- 20 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.
- [0072]** As used herein, the term "cancer" (also used interchangeably with the terms,
- 25 "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 deviation from normal but not associated with a disease state, *e.g.*, cell
- 30 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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

5 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

10 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.

[0073] The 69583 or 85924 molecules of the invention can be used to monitor, treat

15 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. Preferably, the diseases arise from poorly differentiated acute leukemias, *e.g.*,

20 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 (1991) *Crit Rev. in Oncol/Hematol.* 11:267-97); lymphoid malignancies include, but are not limited to acute lymphoblastic leukemia (ALL) which

25 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

30 granular lymphocytic leukemia (LGF), Hodgkin's disease and Reed-Sternberg disease.

[0074] The 69583 or 85924 protein, fragments thereof, and derivatives and other variants of the sequence in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 thereof are collectively referred to as "polypeptides or proteins of the invention" or "69583 or 85924 polypeptides or proteins". Nucleic acid molecules encoding such polypeptides or proteins are

WO 03/035840

PCT/US02/34037

collectively referred to as "nucleic acids of the invention" or "69583 or 85924 nucleic acids."

[0075] 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 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.

[0076] 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.

[0077] As used herein, the term "hybridizes under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions" describes conditions for hybridization and washing. Guidance for performing hybridization reactions can be found in *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, which is incorporated by reference. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. Specific hybridization conditions referred to herein are as follows: 1) low stringency hybridization conditions in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by two washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at least at 50°C (the temperature of the washes can be increased to 55°C for low stringency conditions); 2) medium stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C; 3) high stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C; and preferably 4) very high stringency

WO 03/035840

PCT/US02/34037

hybridization conditions are 0.5M sodium phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C. Very high stringency conditions (4) are the preferred conditions and the ones that should be used unless otherwise specified.

5 [0078] 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).

[0079] As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules which include an open reading frame encoding a 69583 or 85924 protein, preferably a mammalian 69583 or 85924 protein, and can further include non-coding
10 regulatory sequences, and introns.

[0080] 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 69583 or 85924 protein having less than about 30%, 20%, 10% and
15 more preferably 5% (by dry weight), of non-69583 or -85924 protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), or of chemical precursors or non-69583 or -85924 chemicals. When the 69583 or 85924 protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*,
20 culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 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.

[0081] A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of 69583 or 85924 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO:1, 3, 4 or 6) without abolishing or more preferably, without substantially altering a biological activity,
25 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 protein kinase domain or the SH3 domain are predicted to be particularly unamenable to alteration.
30

[0082] 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),

WO 03/035840

PCT/US02/34037

acidic side chains (*e.g.*, aspartic 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, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 69583 or 85924 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 69583 or 85924 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 69583 or 85924 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined.

[0083] As used herein, a "biologically active portion" of a 69583 or 85924 protein includes a fragment of a 69583 or 85924 protein which participates in an interaction between a 69583 or 85924 molecule and a non-69583 or -85924 molecule. Biologically active portions of a 69583 or 85924 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the 69583 or 85924 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, which include fewer amino acids than the full length 69583 or 85924 protein, and exhibit at least one activity of a 69583 or 85924 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 69583 or 85924 protein, *e.g.*, ATP binding, and the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division. A biologically active portion of a 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 69583 or 85924 mediated activity, *e.g.*, ATP binding, and the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division.

[0084] Calculations of homology or sequence identity (the terms "homology" and "identity" are used interchangeably herein) between sequences are performed as follows:

[0085] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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%,
 5 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence (*e.g.*, when aligning a second sequence to the 69583 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 1037 amino acid residues, at least 311, preferably at least 415, more preferably at least 518, even more preferably at least 622, and even more preferably at least 725, 830, or 933 amino acid residues are aligned; when aligning a second sequence to the 85924 amino acid sequence
 10 of SEQ ID NO:5 having 2194 amino acid residues, at least 658, preferably at least 878, more preferably at least 1097, even more preferably at least 1316, and even more preferably at least 1536, 1755, or 1975 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
 15 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
 20 need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

[0086] 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 (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453 algorithm which has been
 25 incorporated into the GAP program in the GCG software package, 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, using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70,
 30 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 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[0087] The percent identity between two amino acid or nucleotide sequences can be determined using the algorithm of Meyers and Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17) 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.

- 5 [0088] 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, 10 score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein molecules of the invention. To obtain 15 gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used.

- [0089] Particular 69583 or 85924 polypeptides of the present invention have an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 20 or SEQ ID NO:5. In the context of an amino acid sequence, the term "substantially identical" is used herein to refer to a first amino acid that contains a sufficient or minimum number of amino acid residues that are i) identical to, or ii) conservative substitutions of aligned amino acid residues in a second amino acid sequence such that the first and second amino acid sequences can have a common structural domain and/or 25 common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain having at least about 60%, or 65% identity, likely 75% identity, more likely 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 are termed substantially identical.

- [0090] In the context of nucleotide sequence, the term "substantially identical" is used 30 herein to refer to a first nucleic acid sequence that contains a sufficient or minimum number of nucleotides that are identical to aligned nucleotides in a second nucleic acid sequence such that the first and second nucleotide sequences encode a polypeptide having common functional activity, or encode a common structural polypeptide domain or a common functional polypeptide activity. For example, nucleotide sequences having at

WO 03/035840

PCT/US02/34037

least about 60%, or 65% identity, likely 75% identity, more likely 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 are termed substantially identical.

- 5 [0091] "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 10 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 15 increase or decrease in the strength of the stimulus.

[0092] "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.

- 20 [0093] 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.

[0094] Various aspects of the invention are described in further detail below.

25 Isolated Nucleic Acid Molecules

- [0095] In one aspect, the invention provides, an isolated or purified, nucleic acid molecule that encodes a 69583 or 85924 polypeptide described herein, *e.g.*, a full length 69583 or 85924 protein or a fragment thereof, *e.g.*, a biologically active portion of 69583 or 85924 protein. Also included is a nucleic acid fragment suitable for use as a 30 hybridization probe, which can be used, *e.g.*, to identify a nucleic acid molecule encoding a polypeptide of the invention, 69583 or 85924 mRNA, and fragments suitable for use as primers, *e.g.*, PCR primers for the amplification or mutation of nucleic acid molecules.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[0096] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:4, or a portion of any of these nucleotide sequences. In one embodiment, the nucleic acid molecules include sequences encoding the human 69583 or 85924 proteins (i.e., "the coding region" of SEQ ID NO:1, as shown in SEQ ID NO:3, and the "coding region" of SEQ ID NO:4, as shown in SEQ ID NO:6), as well as 5' untranslated sequences (nucleotides 1 to 66 of SEQ ID NO:4) and 3' untranslated sequences (nucleotides 3111 to 5549 of SEQ ID NO:1 and nucleotides 6648 to 7825 of SEQ ID NO:4). Alternatively, the nucleic acid molecules can include only the coding regions of SEQ ID NO:1 (e.g., SEQ ID NO:3) and of SEQ ID NO:4 (e.g., SEQ ID NO:6) and, e.g., no flanking sequences which normally accompany the subject sequence. In another embodiment, the nucleic acid molecule encodes a sequence corresponding to a fragment of the protein from about amino acid 41 to 100 of SEQ ID NO:2, from about amino acids 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or from about amino acids 181 to 439 of SEQ ID NO:5.

[0097] 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 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6, or a portion of any of these nucleotide sequences. In other embodiments, the nucleic acid molecule of the invention is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6 such that it can hybridize to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 thereby forming a stable duplex.

[0098] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the present invention includes a nucleotide sequence which is at least about: 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more homologous to the entire length of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, or SEQ ID NO:6 or a portion, preferably of the same length, of any of these nucleotide sequences.

69583 or 85924 Nucleic Acid Fragments

[0099] A nucleic acid molecule of the invention can include only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6. For example, such a nucleic acid molecule can include a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 69583 or 85924 protein, e.g., an

WO 03/035840

PCT/US02/34037

immunogenic or biologically active portion of a 69583 or 85924 protein. A fragment can comprise those nucleotides of SEQ ID NO:1 or of SEQ ID NO:4, which encode a protein kinase domain or a SH3 domain of human 69583 or 85924. The nucleotide sequence determined from the cloning of the 69583 or 85924 gene allows for the generation of
5 probes and primers designed for use in identifying and/or cloning other 69583 or 85924 family members, or fragments thereof, as well as 69583 or 85924 homologs, or fragments thereof, from other species.

[00100] 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' noncoding region. Other embodiments include a fragment which includes a nucleotide
10 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 which are at least 100 amino acids in length. Fragments also include nucleic acid sequences corresponding to specific amino acid sequences described above or
15 fragments thereof. Nucleic acid fragments should not be construed as encompassing those fragments that may have been disclosed prior to the invention.

[00101] 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. Thus, for example, a 69583 or
20 85924 nucleic acid fragment can include a sequence corresponding to protein kinase domain or a SH3 domain, as described herein.

[00102] 69583 or 85924 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
25 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 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6.

[00103] 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
30 should be identical, or differ by 1, or less than in 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00104] A probe or primer can be derived from the sense or anti-sense strand of a nucleic acid which encodes:

[00105] A protein kinase domain at about amino acid residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or at about amino acid residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5; or an SH3 domain at about amino acid residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2.

[00106] 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 69583 or 85924 sequence, *e.g.*, a domain, region, site or other sequence described herein. The primers should be at least 5, 10, or 50 base pairs in length and less than 100, or less than 200, base pairs in length. The primers should be identical, or differ by one base from a sequence disclosed herein or from a naturally occurring variant. For example, primers suitable for amplifying all or a portion of any of the following regions are provided: a protein kinase domain at about amino acid residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or at about amino acid residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5, and a SH3 domain at about amino acid residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2.

[00107] A nucleic acid fragment can encode an epitope bearing region of a polypeptide described herein.

[00108] A nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of a 69583 or 85924 polypeptide" can be prepared by isolating a portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, which encodes a polypeptide having a 69583 or 85924 biological activity (*e.g.*, the biological activities of the 69583 or 85924 proteins are described herein), expressing the encoded portion of the 69583 or 85924 protein (*e.g.*, by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of the 69583 or 85924 protein. For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of 69583 or 85924 includes protein kinase domain, *e.g.*, amino acid residues about 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or at about amino acid residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5, and a SH3 domain at about amino acid residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2. A nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of a 69583 or 85924 polypeptide, can comprise a nucleotide sequence which is greater than 300 or more nucleotides in length.

[00109] In preferred embodiments, a nucleic acid includes a nucleotide sequence which is about 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4120, 4140,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

4160, 4180, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5320, 5340, 5360, 5380, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6.

69583 or 85924 Nucleic Acid Variants

[00110] The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6. Such differences can be due to degeneracy of the genetic code (and result in a nucleic acid which encodes the same 69583 or 85924 proteins as those encoded by the nucleotide sequence disclosed herein. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence which differs, by at least 1, but less than 5, 10, 20, 50, or 100 amino acid residues that shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5. 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.

[00111] Nucleic acids of the inventor can be chosen for having codons, which are preferred, or non-preferred, for a particular expression system. *E.g.*, the nucleic acid can be one in which at least one codon, at 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.

[00112] 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 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).

[00113] In a preferred embodiment, the nucleic acid differs from that of SEQ ID NO: 1, 3, 4 or 6 *e.g.*, as follows: by at least one but less than 10, 20, 30, or 40 nucleotides; at least one but less than 1%, 5%, 10% or 20% of the nucleotides in the subject nucleic acid. If necessary for this analysis the sequences should be aligned for maximum homology.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

"Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

[00114] 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
 5 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 SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 or a fragment of these sequences. Such nucleic acid molecules can readily be identified as being able to hybridize under stringent conditions, to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 or a
 10 fragment of the sequences. Nucleic acid molecules corresponding to orthologs, homologs, and allelic variants of the 69583 or 85924 cDNAs of the invention can further be isolated by mapping to the same chromosome or locus as the 69583 or 85924 gene.

[00115] Preferred variants include those that are correlated with the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division.

15 [00116] Allelic variants of 69583 or 85924, *e.g.*, human 69583 or 85924, include both functional and non-functional proteins. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the 69583 or 85924 protein within a population that maintain the ability to bind ATP. Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5,
 20 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 69583 or 85924, *e.g.*, human 69583 or 85924, protein within a population that do not have the ability to bind ATP. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, a deletion, or insertion, or premature truncation
 25 of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, or a substitution, insertion, or deletion in critical residues or critical regions of the protein.

[00117] Moreover, nucleic acid molecules encoding other 69583 or 85924 family members and, thus, which have a nucleotide sequence which differs from the 69583 or 85924 sequences of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6 are
 30 intended to be within the scope of the invention.

Antisense Nucleic Acid Molecules, Ribozymes and Modified 69583 or 85924 Nucleic Acid Molecules

[00118] In another aspect, the invention features, an isolated nucleic acid molecule which is antisense to 69583 or 85924. An "antisense" nucleic acid can include a

WO 03/035840

PCT/US02/34037

nucleotide sequence which 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 sequence. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 69583 or 85924 coding strand, or to only a portion thereof (*e.g.*, the coding region of human 69583 corresponding to SEQ ID NO:3 and the coding region of human 85924 corresponding to SEQ ID NO:6). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding 69583 or 85924 (*e.g.*, the 5' and 3' untranslated regions).

[00119] An antisense nucleic acid can be designed such that it is complementary to the entire coding region of 69583 or 85924 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 69583 or 85924 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 69583 or 85924 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, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, or more nucleotides in length.

[00120] 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 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 subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

[00121] 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 69583 or 85924 protein to thereby 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 or

WO 03/035840

PCT/US02/34037

selectively bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which 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

- 5 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.

[00122] In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an α -anomeric nucleic acid molecule. An α -anomeric nucleic acid molecule
10 forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β -units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

- 15 [00123] In still another embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. A ribozyme having specificity for a 69583- or 85924-encoding nucleic acid can include one or more sequences complementary to the nucleotide sequence of a 69583 or 85924 cDNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6), and a sequence having known catalytic sequence responsible for mRNA
20 cleavage (see U.S. Pat. No. 5,093,246 or Haselhoff and Gerlach (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 69583- or 85924-encoding mRNA. See, *e.g.*, Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, 69583 or
25 85924 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel and Szostak (1993) *Science* 261:1411-1418.

[00124] 69583 or 85924 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 69583 or 85924 (*e.g.*, the 69583
30 or 85924 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 69583 or 85924 gene in target cells. See generally, Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15. The potential sequences that can be targeted for triple helix formation can be increased by creating a so-called "switchback" nucleic acid

WO 03/035840

PCT/US02/34037

molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair 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.

- 5 [00125] The invention also provides detectably labeled oligonucleotide primer and probe molecules. Typically, such labels are chemiluminescent, fluorescent, radioactive, or colorimetric.
- [00126] A 69583 or 85924 nucleic acid molecule can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, *e.g.*, the stability, hybridization, or
- 10 solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup *et al.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4: 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acid" or "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
- 15 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.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14670-675.
- 20 [00127] PNAs of 69583 or 85924 nucleic acid molecules can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of 69583 or 85924 nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a
- 25 gene, (*e.g.*, by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used in combination with other enzymes, (*e.g.*, S1 nucleases (Hyrup *et al.* (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).
- [00128] In other embodiments, the oligonucleotide can include other appended groups
- 30 such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *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 No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-

WO 03/035840

PCT/US02/34037

triggered cleavage agents (see, *e.g.*, Krol *et al.* (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) or intercalating agents. (see, *e.g.*, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). To this end, the oligonucleotide can be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

- 5 **[00129]** The invention also includes molecular beacon oligonucleotide primer and probe molecules having at least one region which is complementary to a 69583 or 85924 nucleic acid of the invention, two complementary regions one having a fluorophore and one a quencher such that the molecular beacon is useful for quantitating the presence of the 69583 or 85924 nucleic acid of the invention in a sample. Molecular beacon nucleic
10 acids are described, for example, in Lizardi *et al.*, U.S. Patent No. 5,854,033; Nazarenko *et al.*, U.S. Patent No. 5,866,336, and Livak *et al.*, U.S. Patent 5,876,930.

Isolated 69583 or 85924 Polypeptides

- [00130]** In another aspect, the invention features, an isolated 69583 or 85924 protein, or fragment, *e.g.*, a biologically active portion, for use as immunogens or antigens to raise
15 or test (or more generally to bind) anti-69583 or -85924 antibodies. 69583 or 85924 protein can be isolated from cells or tissue sources using standard protein purification techniques. 69583 or 85924 protein or fragments thereof can be produced by recombinant DNA techniques or synthesized chemically.

- [00131]** Polypeptides of the invention include those which arise as a result of the
20 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,
25 *e.g.*, glycosylation or cleavage, present in a native cell.

- [00132]** In a preferred embodiment, a 69583 polypeptide has one or more of the following characteristics: 1) it has the ability to bind ATP; 2) it has the ability to regulate biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division; 3) it has the ability to mediate inflammation of smooth muscle; 4) it has the ability to
30 mediate, initiate or perpetuate the asthmatic response; 5) it has the ability to phosphorylate a substrate molecule *e.g.* at a serine, threonine and/or tyrosine residue; 6) it has the ability to act as a substrate for phosphorylation; 7) it has a molecular weight, *e.g.*, a deduced molecular weight, preferably ignoring any contribution of post translational modifications, amino acid composition or other physical characteristic of a 69583

WO 03/035840

PCT/US02/34037

polypeptide, *e.g.*, a polypeptide of SEQ ID NO:2; 8) it has an overall sequence similarity of at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80, 90, or 95%, with a polypeptide of SEQ ID NO:2; 9) it is expressed in at least the following human tissues and cell lines: at high levels in kidney and pancreas and at medium levels in lung and ovarian tumors; 10) it has a protein kinase domain which is preferably about 70%, 80%, 90% or 95% identical to amino acid residues about 124 to 398 of SEQ ID NO:2; 11) it has an SH3 domain which is preferably about 70%, 80%, 90% or 95% identical to amino acid residues about 41 to 100 of SEQ ID NO:2; 12) it has a protein kinases ATP-binding region signature; 13) it has a serine/threonine protein kinase active-site signature; and 14) it has a coiled coil pattern.

[00133] In a preferred embodiment, a 85924 polypeptide has one or more of the following characteristics: 1) it has the ability to bind ATP; 2) it has the ability to regulate biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division; 3) it has the ability to mediate inflammation of smooth muscle; 4) it has the ability to mediate, initiate or perpetuate the asthmatic response; 5) it has the ability to phosphorylate a substrate molecule *e.g.* at a serine, threonine and/or tyrosine residue; 6) it has the ability to act as a substrate for phosphorylation; 7) it has a molecular weight, *e.g.*, a deduced molecular weight, preferably ignoring any contribution of post translational modifications, amino acid composition or other physical characteristic of a 85924 polypeptide, *e.g.*, a polypeptide of SEQ ID NO:5; 8) it has an overall sequence similarity of at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80, 90, or 95%, with a polypeptide of SEQ ID NO:5; 9) it has a protein kinase domain which is preferably about 70%, 80%, 90% or 95% identical to amino acid residues about 181 to 439 of SEQ ID NO:5; 10) it has a serine/threonine protein kinase active-site signature; 11) it has a RGD cell attachment sequence, and 12) it has a leucine zipper pattern.

[00134] In a preferred embodiment the 69583 or 85924 protein, or fragment thereof, differs from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5. In one embodiment it differs by at least one but by less than 15, 10 or 5 amino acid residues. In another it differs from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 by at least one residue but less than 20%, 15%, 10% or 5% of the residues in it differ from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5. (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 residue or a

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- conservative substitution. In a preferred embodiment the differences are not in the protein kinase domain at about residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or at about residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5, or in the SH3 domain at about residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2. In another embodiment one or more differences are in the protein kinase domain at about residues 124 to 398 of SEQ ID NO:2 or at about residues 181 to 439 of SEQ ID NO:5, or in the SH3 domain at about residues 41 to 100 of SEQ ID NO:2.
- 5 [00135] Other embodiments include a protein that contains one or more changes in amino acid sequence, *e.g.*, a change in an amino acid residue which is not essential for activity. Such 69583 or 85924 proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, yet retain biological activity.
- 10 [00136] 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 or SEQ ID NO:5.
- 15 [00137] A 69583 protein or fragment is provided which varies from the sequence of SEQ ID NO:2 in regions defined by amino acids about 400 to 1000 by at least one but by less than 15, 10 or 5 amino acid residues in the protein or fragment but which does not differ from SEQ ID NO:2 in regions defined by amino acids about 41 to 100 or 124 to 398. A 85924 protein or fragment is provided which varies from the sequence of SEQ ID NO:5 in regions defined by amino acids about 1 to 175 or 450 to 2190 by at least one but
- 20 by less than 15, 10 or 5 amino acid residues in the protein or fragment but which does not differ from SEQ ID NO:5 in regions defined by amino acids about 181 to 439. (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
- 25 conservative substitution, while in others the difference is at an essential residue or is a non-conservative substitution.
- [00138] In one embodiment, a biologically active portion of a 69583 or 85924 protein includes a protein kinase domain and/or a SH3 domain. Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by
- 30 recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native 69583 or 85924 protein.
- [00139] In a preferred embodiment, the 69583 or 85924 protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5. In other embodiments, the 69583 or 85924 protein is sufficiently or substantially identical to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

In yet another embodiment, the 69583 or 85924 protein is sufficiently or substantially identical to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, as described in detail in the subsections above.

69583 or 85924 Chimeric or Fusion Proteins

- 5 [00140] In another aspect, the invention provides 69583 or 85924 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 69583 or 85924 "chimeric protein" or "fusion protein" includes a 69583 or 85924 polypeptide linked to a non-69583 or -85924 polypeptide. A "non-69583 or -85924 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 69583 or 85924 protein, *e.g.*, a protein which is different from the 69583 or 85924 protein and which is derived from the same or a different organism. The 69583 or 85924 polypeptide of the fusion protein can correspond to all or a portion *e.g.*, a fragment described herein of a 69583 or 85924 amino acid sequence. In a preferred embodiment, a 69583 or 85924 fusion protein includes at least one (or two) biologically active portion of a 69583 or 15 85924 protein. The non-69583 or 85924 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the 69583 or 85924 polypeptide.

- [00141] The fusion protein can include a moiety which has a high affinity for a ligand. For example, the fusion protein can be a GST-69583 or -85924 fusion protein in which the 69583 or 85924 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such 20 fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 69583 or 85924. Alternatively, the fusion protein can be a 69583 or 85924 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of 69583 or 85924 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

- 25 [00142] 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.

- [00143] The 69583 or 85924 fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 69583 or 85924 30 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 69583 or 85924 substrate. 69583 or 85924 fusion proteins can be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene

WO 03/035840

PCT/US02/34037

encoding a 69583 or 85924 protein; (ii) mis-regulation of the 69583 or 85924 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 69583 or 85924 protein.

[00144] Moreover, the 69583- or 85924-fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-69583 or -85924 antibodies in a subject, to purify 69583 or 85924 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 69583 or 85924 with a 69583 or 85924 substrate.

[00145] Expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A 69583- or 85924-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 69583 or 85924 protein.

Variants of 69583 or 85924 Proteins

[00146] In another aspect, the invention also features a variant of a 69583 or 85924 polypeptide, *e.g.*, which functions as an agonist (mimetics) or as an antagonist. Variants of the 69583 or 85924 proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation, the insertion or deletion of sequences or the truncation of a 69583 or 85924 protein. An agonist of the 69583 or 85924 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 69583 or 85924 protein. An antagonist of a 69583 or 85924 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 69583 or 85924 protein by, for example, competitively modulating a 69583- or 85924-mediated activity of a 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein.

[00147] Variants of a 69583 or 85924 protein can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a 69583 or 85924 protein for agonist or antagonist activity.

[00148] Libraries of fragments *e.g.*, N terminal, C terminal, or internal fragments, of a 69583 or 85924 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection of variants of a 69583 or 85924 protein.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00149] Variants in which a cysteine residues is added or deleted or in which a residue which is glycosylated is added or deleted are particularly preferred.

[00150] 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 are known in the art. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify 69583 or 85924 variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6:327-331).

[00151] Cell based assays can be exploited to analyze a variegated 69583 or 85924 library. For example, a library of expression vectors can be transfected into a cell line, *e.g.*, a cell line, which ordinarily responds to 69583 or 85924 in a substrate-dependent manner. The transfected cells are then contacted with 69583 or 85924 and the effect of the expression of the mutant on signaling by the 69583 or 85924 substrate can be detected, *e.g.*, by measuring binding of ATP. Plasmid DNA can then be recovered from the cells which score for inhibition, or alternatively, potentiation of signaling by the 69583 or 85924 substrate, and the individual clones further characterized.

[00152] In another aspect, the invention features a method of making a 69583 or 85924 polypeptide, *e.g.*, a peptide having a non-wild type activity, *e.g.*, an antagonist, agonist, or super agonist of a naturally occurring 69583 or 85924 polypeptide, *e.g.*, a naturally occurring 69583 or 85924 polypeptide. The method includes altering the sequence of a 69583 or 85924 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.

[00153] In another aspect, the invention features a method of making a fragment or analog of a 69583 or 85924 polypeptide a biological activity of a naturally occurring 69583 or 85924 polypeptide. The method includes altering the sequence, *e.g.*, by substitution or deletion of one or more residues, of a 69583 or 85924 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 activity.

Anti-69583 or -85924 Antibodies

[00154] In another aspect, the invention provides an anti-69583 or -85924 antibody. The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule or immunologically active portion thereof, *i.e.*, an antigen-binding portion. Examples of

WO 03/035840

PCT/US02/34037

immunologically active portions of immunoglobulin molecules include scFV and dcFV fragments, Fab and F(ab')₂ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as papain or pepsin, respectively.

- 5 [00155] The antibody can be a polyclonal, monoclonal, recombinant, *e.g.*, a chimeric or 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.

- 10 [00156] A full-length 69583 or 85924 protein or, antigenic peptide fragment of 69583 or 85924 can be used as an immunogen or can be used to identify anti-69583 or -85924 antibodies made with other immunogens, *e.g.*, cells, membrane preparations, and the like. The antigenic peptide of 69583 or 85924 should include at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5 and encompasses an epitope of 69583 or 85924. Preferably, the antigenic peptide includes at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at
- 15 least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

- [00157] Fragments of 69583 which include residues from about amino acid 50 to 61, from about 220 to 231, from about 292 to 302, from about 380 to 390, from about 410 to 422, from about 432 to 445, from about 452 to 470, from about 490 to 511, from about 531 to 545, from about 561 to 571, from about 580 to 591, from about 601 to 611, from
- 20 about 641 to 651, from about 653 to 661, from about 675 to 691, from about 751 to 761, from about 765 to 775, from about 882 to 901 and from about 1002 to 1012 of SEQ ID NO:2 can be used to make, *e.g.*, used as immunogens or used to characterize the specificity of an antibody, antibodies against hydrophilic regions of the 69583 protein (see Figure 1). Similarly, fragments of 69583 which include residues from about amino
- 25 acid 329 to 337, from about 345 to 355, from about 391 to 400, from about 723 to 738 and from about 902 to 920 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against a hydrophobic region of the 69583 protein; a fragment of 69583 which include residues about 41 to 50, 51 to 60, 61 to 70, 71 to 80, 81 to 90, or about 91 to 100 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against the SH3 domain of the 69583 protein; a fragment
- 30 of 69583 which include residues about 124 to 135, 136 to 147, 148 to 159, 160 to 171, 172 to 183, 184 to 195, 196 to 207, 208 to 219, 220 to 231, 232 to 243, 244 to 255, 256 to 267, 268 to 279, 280 to 291, 292 to 303, 304 to 315, 316 to 327, 328 to 339, 340 to 351, 352 to 363, 364 to 375, 376 to 387 or about 388 to 398 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against the protein kinase domain of the 69583 protein.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00158] Fragments of 85924 which include residues from about amino acid 18 to 31, from about 151 to 171, from about 211 to 231, from about 465 to 481, from about 540 to 551, from about 570 to 582, from about 861 to 875, from about 1051 to 1065, from about 1101 to 1121, from about 1200 to 1218, from about 1280 to 1300, from about 1411 to 1425, from about 1591 to 1601, from about 1620 to 1640, from about 1661 to 1671, from about 1740 to 1755, from about 1812 to 1840, from about 1880 to 1891, from about 1911 to 1921, from about 1970 to 1990, from about 2040 to 2052, from about 2080 to 2091 and from about 2170 to 2180 of SEQ ID NO:5 can be used to make, *e.g.*, used as immunogens or used to characterize the specificity of an antibody, antibodies against hydrophilic regions of the 85924 protein (see Figure 2). Similarly, fragments of 85924 which include residues from about amino acid 361 to 371, from about 721 to 732, from about 761 to 771, from about 821 to 841, from about 970 to 982, from about 1375 to 1390, from about 1431 to 1445, and from about 2124 to 2134 of SEQ ID NO:5 can be used to make an antibody against a hydrophobic region of the 85924 protein; a fragment of 85924 which include residues about 181 to 194, 195 to 207, 208 to 221, 222 to 234, 235 to 247, 248 to 260, 261 to 274, 275 to 287, 288 to 302, 303 to 315, 316 to 328, 329 to 341, 342 to 354, 355 to 368, 369 to 382, 383 to 396, 397 to 410, 411 to 424 or about 425 to 439 of SEQ ID NO:5 can be used to make an antibody against the protein kinase domain of the 85924 protein
- [00159] Antibodies reactive with, or specific or selective for, any of these regions, or other regions or domains described herein are provided.
- [00160] Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 69583 or 85924 located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity. For example, an Ermini surface probability analysis of the human 69583 or 85924 protein sequences can be used to indicate the regions that have a particularly high probability of being localized to the surface of the 69583 or 85924 proteins and are thus likely to constitute surface residues useful for targeting antibody production.
- [00161] In a preferred embodiment the antibody binds an epitope on any domain or region on 69583 or 85924 proteins described herein.
- [00162] Additionally, chimeric, humanized, and completely human antibodies are also within the scope of the invention. Chimeric, humanized, but most preferably, completely human antibodies are desirable for applications which include repeated administration, *e.g.*, therapeutic treatment of human patients, and some diagnostic applications.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00163] Chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, can be made using standard recombinant DNA techniques. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.*
- 5 International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559).
- 10 [00164] A humanized or complementarity determining region (CDR)-grafted antibody will have at least one or two, but generally all three recipient CDR's (of heavy and or light immunoglobulin chains) replaced with a donor CDR. The antibody may be replaced with at least a portion of a non-human CDR or only some of the CDR's may be replaced with non-human CDR's. It is only necessary to replace the number of CDR's required for binding of the humanized antibody to a 69583 or 85924 or a fragment thereof.
- 20 Preferably, the donor will be a rodent antibody, *e.g.*, a rat or mouse antibody, and the recipient will be a human framework or a human consensus framework. Typically, the immunoglobulin providing the CDR's is called the "donor" and the immunoglobulin providing the framework is called the "acceptor." In one embodiment, the donor immunoglobulin is a non-human (*e.g.*, rodent). The acceptor framework is a naturally-
- 25 occurring (*e.g.*, a human) framework or a consensus framework, or a sequence about 85% or higher, preferably 90%, 95%, 99% or higher identical thereto.
- [00165] As used herein, the term "consensus sequence" refers to the sequence formed from the most frequently occurring amino acids (or nucleotides) in a family of related sequences (See *e.g.*, Winnaker, (1987) *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany). In a family of proteins, each position in the consensus sequence is occupied by the amino acid occurring most frequently at that position in the family. If two amino acids occur equally frequently, either can be included in the consensus sequence. A "consensus framework" refers to the framework region in the consensus immunoglobulin sequence.
- 30

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00166] An antibody can be humanized by methods known in the art. Humanized antibodies can be generated by replacing sequences of the Fv variable region which are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207, by Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214, and by Queen *et al.* US patent Nos. 5,585,089, 5,693,761 and 5,693,762, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Those methods include isolating, manipulating, and expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable regions from at least one of a heavy or light chain. Sources of such nucleic acid are well known to those skilled in the art and, for example, may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a 69583 or 85924 polypeptide or fragment thereof. The recombinant DNA encoding the humanized antibody, or fragment thereof, can then be cloned into an appropriate expression vector.
- [00167] Humanized or CDR-grafted antibodies can be produced by CDR-grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDR's of an immunoglobulin chain can be replaced. See *e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US patent No. 5,225,539, the contents of all of which are hereby expressly incorporated by reference. Winter describes a CDR-grafting method which may be used to prepare the humanized antibodies of the present invention (UK Patent Application GB 2188638A, filed on March 26, 1987; Winter US patent No. 5,225,539), the contents of which is expressly incorporated by reference.
- [00168] Also within the scope of the invention are humanized antibodies in which specific amino acids have been substituted, deleted or added. Preferred humanized antibodies have amino acid substitutions in the framework region, such as to improve binding to the antigen. For example, a humanized antibody will have framework residues identical to the donor framework residue or to another amino acid other than the recipient framework residue. To generate such antibodies, a selected, small number of acceptor framework residues of the humanized immunoglobulin chain can be replaced by the corresponding donor amino acids. Preferred locations of the substitutions include amino acid residues adjacent to the CDR, or which are capable of interacting with a CDR (see *e.g.*, US patent No. 5,585,089). Criteria for selecting amino acids from the donor are described in US 5,585,089, *e.g.*, columns 12-16 of US 5,585,089, the *e.g.*, columns 12-16 of US 5,585,089, the contents of which are hereby incorporated by reference. Other

WO 03/035840

PCT/US02/34037

techniques for humanizing antibodies are described in Padlan *et al.* EP 519596 A1, published on December 23, 1992.

[00169] Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Such antibodies can be produced using transgenic mice that are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. See, for example, Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; and U.S. Patent Nos. 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; and 5,545,806. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and Medarex, Inc. (Princeton, NJ), can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

[00170] Completely human antibodies that recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, *e.g.*, a murine antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. This technology is described by Jespers *et al.* (1994) *Bio/Technology* 12:899-903).

[00171] The anti-69583 or -85924 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.* 880:263-80; and Reiter (1996) *Clin. Cancer Res.* 2:245-52.

The single chain antibody can be dimerized or multimerized to generate multivalent antibodies having specificities for different epitopes of the same target 69583 or 85924 protein.

[00172] In a preferred embodiment, the antibody has reduced or no ability to bind an Fc receptor. For example, it is an isotype or subtype, fragment or other mutant, which does not support binding to an Fc receptor, *e.g.*, it has a mutagenized or deleted Fc receptor binding region.

[00173] An antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive 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, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, puromycin, maytansinoids, *e.g.*, maytansinol (see US Patent No. 5,208,020), CC-1065 (see US Patent Nos. 5,475,092, 5,585,499,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

5,846,545) 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, CC-1065, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU),

5 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, vinblastine, taxol and maytansinoids). Radioactive ions include, but are

10 not limited to iodine, yttrium and praseodymium.

[00174] The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the therapeutic moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the therapeutic moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin

15 such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, α -interferon, β -interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony

20 stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

[00175] Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980.

[00176] An anti-69583 or -85924 antibody (*e.g.*, monoclonal antibody) can be used to isolate 69583 or 85924 by standard techniques, such as affinity chromatography or

25 immunoprecipitation. Moreover, an anti-69583 or -85924 antibody can be used to detect 69583 or 85924 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the protein. Anti-69583 or -85924 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be

30 facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance (*i.e.*, antibody labelling). Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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 .
- [00177] In preferred embodiments, an antibody can be made by immunizing with a purified 69583 or 85924 antigen, or a fragment thereof, *e.g.*, a fragment described herein, a membrane associated antigen, tissues, *e.g.*, crude tissue preparations, whole cells, preferably living cells, lysed cells, or cell fractions.
- [00178] Antibodies which bind only a native 69583 or 85924 protein, only denatured or otherwise non-native 69583 or 85924 protein, or which bind both, are within the invention. Antibodies with linear or conformational epitopes are within the invention. Conformational epitopes sometimes can be identified by identifying antibodies which bind to native but not denatured 69583 or 85924 protein.
- Recombinant Expression Vectors, Host Cells and Genetically Engineered Cells
- [00179] 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.
- [00180] A vector can include a 69583 or 85924 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 which 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

polypeptides, including fusion proteins or polypeptides, encoded by nucleic acids as described herein (*e.g.*, 69583 or 85924 proteins, mutant forms of 69583 or 85924 proteins, fusion proteins, and the like).

- [00181] The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of 69583 or 85924 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 Diego, CA. Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.
- [00182] 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 and Johnson (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.
- [00183] Purified fusion proteins can be used in 69583 or 85924 activity assays, (*e.g.*, direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific or selective for 69583 or 85924 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 which are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (*e.g.*, six weeks).

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00184] To maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California 119-128). Another strategy is to
- 5 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) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.
- [00185] The 69583 or 85924 expression vector can be a yeast expression vector, a
- 10 vector for expression in insect cells, *e.g.*, a baculovirus expression vector or a vector suitable for expression in mammalian cells.
- [00186] When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40.
- 15 [00187] 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
- 20 (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (*e.g.*, the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund *et al.*
- 25 (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (*e.g.*, milk whey promoter; U.S. Patent No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example, the murine hox promoters (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) and the α -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).
- 30 [00188] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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 *et al.*, (1986) *Reviews - Trends in Genetics* 1:1.

- 5 [00189] Another aspect the invention provides a host cell which includes a nucleic acid molecule described herein, *e.g.*, a 69583 or 85924 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 69583 or 85924 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
- 10 herein. Such terms refer not only to the particular subject cell but 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 still included within the scope of the term as used herein.
- 15 [00190] A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a 69583 or 85924 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 CV-1 origin, SV-40 (COS) cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.
- [00191] Vector DNA can be introduced into host cells via conventional transformation
- 20 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-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation.
- [00192] A host cell of the invention can be used to produce (*i.e.*, express) a 69583 or
- 25 85924 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 69583 or 85924 protein is produced. In another embodiment, the
- 30 method further includes isolating a 69583 or 85924 protein from the medium or the host cell.
- [00193] In another aspect, the invention features, a cell or purified preparation of cells which include a 69583 or 85924 transgene, or which otherwise misexpress 69583 or 85924. The cell preparation can consist of human or non-human cells, *e.g.*, rodent cells,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- e.g.*, mouse or rat cells, rabbit cells, or pig cells. In preferred embodiments, the cell or cells include a 69583 or 85924 transgene, *e.g.*, a heterologous form of a 69583 or 85924, *e.g.*, a gene derived from humans (in the case of a non-human cell). The 69583 or 85924 transgene can be misexpressed, *e.g.*, overexpressed or underexpressed. In other preferred
- 5 embodiments, the cell or cells include a gene which misexpresses an endogenous 69583 or 85924, *e.g.*, a gene the expression of which is disrupted, *e.g.*, a knockout. Such cells can serve as a model for studying disorders which are related to mutated or misexpressed 69583 or 85924 alleles or for use in drug screening.
- 10 **[00194]** In another aspect, the invention features, a human cell, *e.g.*, a hematopoietic stem cell, transformed with nucleic acid which encodes a subject 69583 or 85924 polypeptide.
- 15 **[00195]** Also provided are cells, preferably human cells, *e.g.*, human hematopoietic or fibroblast cells, in which an endogenous 69583 or 85924 is under the control of a regulatory sequence that does not normally control the expression of the endogenous
- 20 69583 or 85924 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 69583 or 85924 gene. For example, an endogenous 69583 or 85924 gene which is "transcriptionally silent," *e.g.*, not normally expressed, or
- 25 expressed only at very low levels, can be activated by inserting a regulatory element which is capable of promoting the expression of a normally expressed gene product in that cell. Techniques such as targeted homologous recombinations, can be used to insert the heterologous DNA as described in, *e.g.*, Chappel, US 5,272,071; WO 91/06667, published in May 16, 1991.
- 30 **[00196]** The invention provides non-human transgenic animals. Such animals are useful for studying the function and/or activity of a 69583 or 85924 protein and for identifying and/or evaluating modulators of 69583 or 85924 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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 69583 or 85924 gene has been
- 5 altered by, *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.
- [00197]** Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific
- 10 regulatory sequence(s) can be operably linked to a transgene of the invention to direct expression of a 69583 or 85924 protein to particular cells. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of a 69583 or 85924 transgene in its genome and/or expression of 69583 or 85924 mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the
- 15 transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene encoding a 69583 or 85924 protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.
- [00198]** 69583 or 85924 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
- 20 placed under the control of a tissue 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.
- [00199]** The invention also includes a population of cells from a transgenic animal, as discussed, *e.g.*, below.
- 25 Uses
- [00200]** The nucleic acid molecules, proteins, protein homologs, 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
- 30 prophylactic).
- [00201]** The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used, for example, to express a 69583 or 85924 protein (*e.g.*, via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect a 69583 or 85924 mRNA (*e.g.*, in a biological

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- sample) or a genetic alteration in a 69583 or 85924 gene, and to modulate 69583 or 85924 activity, as described further below. The 69583 or 85924 proteins can be used to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of a 69583 or 85924 substrate or production of 69583 or 85924 inhibitors. In addition, the 69583 or 85924 proteins can be used to screen for naturally occurring 69583 or 85924 substrates, to screen for drugs or compounds which modulate 69583 or 85924 activity, as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of 69583 or 85924 protein or production of 69583 or 85924 protein forms which have decreased, aberrant or unwanted activity compared to 69583 or 85924 wild type protein (*e.g.*, aberrant or deficient proliferative and/or differentiative disorders *e.g.*, carcinoma sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic disorders, *e.g.*, leukemias, function or expression). Moreover, the anti-69583 or -85924 antibodies of the invention can be used to detect and isolate 69583 or 85924 proteins, regulate the bioavailability of 69583 or 85924 proteins, and modulate 69583 or 85924 activity.
- 15 [00202] A method of evaluating a compound for the ability to interact with, *e.g.*, bind, a subject 69583 or 85924 polypeptide is provided. The method includes: contacting the compound with the subject 69583 or 85924 polypeptide; and evaluating ability of the compound to interact with, *e.g.*, to bind or form a complex with the subject 69583 or 85924 polypeptide. This method can be performed *in vitro*, *e.g.*, in a cell free system, or
- 20 *in vivo*, *e.g.*, in a two-hybrid interaction trap assay. This method can be used to identify naturally occurring molecules which interact with subject 69583 or 85924 polypeptide. It can also be used to find natural or synthetic inhibitors of subject 69583 or 85924 polypeptide. Screening methods are discussed in more detail below.

Screening Assays:

- 25 [00203] The invention provides methods (also referred to herein as "screening 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 to 69583 or 85924 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, 69583 or 85924 expression or 69583 or 85924 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect
- 30 on, for example, the expression or activity of a 69583 or 85924 substrate. Compounds thus identified can be used to modulate the activity of target gene products (*e.g.*, 69583 or 85924 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00204] In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which are substrates of a 69583 or 85924 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof. In another embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of a
- 5 69583 or 85924 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof.
- [00205] 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
- 10 degradation but which nevertheless remain bioactive; see, *e.g.*, Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85); 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
- 15 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).
- [00206] Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909-13; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-426; Zuckermann *et al.* (1994) *J.*
- 20 *Med. Chem.* 37:2678-85; 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 in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51.
- [00207] 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
- 25 (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner, USP 5,223,409), spores (Ladner USP '409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) or on phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirlla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra.*).
- 30 [00208] In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 69583 or 85924 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 69583 or 85924 activity is determined. Determining the ability of the test compound to modulate 69583 or 85924 activity can be accomplished by monitoring, for example, biochemical and

WO 03/035840

PCT/US02/34037

morphological changes associated with cellular growth and division. The cell, for example, can be of mammalian origin, *e.g.*, human.

[00209] The ability of the test compound to modulate 69583 or 85924 binding to a compound, *e.g.*, a 69583 or 85924 substrate, or to bind to 69583 or 85924 can also be
5 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 69583 or 85924 can be determined by detecting the labeled compound, *e.g.*, substrate, in a complex. Alternatively, 69583 or 85924 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate
10 69583 or 85924 binding to a 69583 or 85924 substrate in a complex. For example, compounds (*e.g.*, 69583 or 85924 substrates) can be labeled with ¹²⁵I, ¹⁴C, ³⁵S or ³H, either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or
15 luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

[00210] The ability of a compound (*e.g.*, a 69583 or 85924 substrate) to interact with 69583 or 85924 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
20 with 69583 or 85924 without the labeling of either the compound or the 69583 or 85924. 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
25 compound and 69583 or 85924.

[00211] In yet another embodiment, a cell-free assay is provided in which a 69583 or 85924 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to the 69583 or 85924 protein or biologically active portion thereof is evaluated. Preferred biologically active portions of the 69583 or
30 85924 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-69583 or -85924 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores.

[00212] Soluble and/or membrane-bound forms of isolated proteins (*e.g.*, 69583 or 85924 proteins or biologically active portions thereof) can be used in the cell-free assays

WO 03/035840

PCT/US02/34037

of the invention. When membrane-bound forms of the protein are used, it may 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-

5 114, Thesit®, Isotridecypoly(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.

[00213] Cell-free assays involve preparing a reaction mixture of the target gene protein
10 and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex that can be removed and/or detected.

[00214] The interaction between two molecules can also be detected, *e.g.*, using fluorescence energy transfer (FET) (see, for example, Lakowicz *et al.*, U.S. Patent No.
15 5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, U.S. Patent No. 4,868,103). A fluorophore label on the first, 'donor' molecule is selected such that its emitted 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
20 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 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
25 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).

[00215] In another embodiment, determining the ability of the 69583 or 85924 protein to bind to a target molecule can be accomplished using real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (see, *e.g.*, Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345
30 and Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). "Surface plasmon resonance" or "BIA" detects biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore). Changes in the mass at the binding surface (indicative of a binding event) result in alterations of the refractive index of light near the surface (the

WO 03/035840

PCT/US02/34037

optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR)), resulting in a detectable signal which can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

[00216] 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.

[00217] It may be desirable to immobilize either 69583 or 85924, an anti-69583 or -85924 antibody or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a 69583 or 85924 protein, or interaction of a 69583 or 85924 protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for 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/69583 or 85924 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, 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 69583 or 85924 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to 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 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 69583 or 85924 binding or activity determined using standard techniques.

[00218] Other techniques for immobilizing either a 69583 or 85924 protein or a target molecule on matrices include using conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 69583 or 85924 protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (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).

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00219] 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, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of
- 5 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
- 10 complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific or selective for the immobilized component (the antibody, in turn, can be directly labeled or indirectly labeled with, *e.g.*, a labeled anti-Ig antibody).
- [00220] In one embodiment, this assay is performed utilizing antibodies reactive with 69583 or 85924 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 69583 or 85924 protein to its target molecule. Such antibodies can be derivatized to the
- 15 wells of the plate, and unbound target or 69583 or 85924 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 69583 or 85924 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated
- 20 with the 69583 or 85924 protein or target molecule.
- [00221] Alternatively, cell free assays can be conducted in a liquid phase. In such an assay, the reaction products are separated from unreacted components, by any of a number of standard techniques, including but not limited to: differential centrifugation (see, for example, Rivas and Minton (1993) *Trends Biochem Sci* 18:284-7);
- 25 chromatography (gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography); electrophoresis (see, *e.g.*, Ausubel *et al.*, eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York.); and immunoprecipitation (see, for example, Ausubel *et al.*, eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York). Such resins and chromatographic techniques are known to one skilled in the art (see, *e.g.*,
- 30 Heegaard (1998) *J Mol Recognit* 11:141-8; Hage and Tweed (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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00222] In a preferred embodiment, the assay includes contacting the 69583 or 85924 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a 69583 or 85924 protein includes determining the ability of the test compound to preferentially bind to 69583 or 85924 or biologically active portion thereof, or to modulate the activity of a target molecule, as compared to the known compound.
- [00223] 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 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 69583 or 85924 genes herein identified. In an alternative embodiment, the invention provides methods for determining the ability of the test compound to modulate the activity of a 69583 or 85924 protein through modulation of the activity of a downstream effector of a 69583 or 85924 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.
- [00224] 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 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 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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

[00225] 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 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.

[00226] 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 or selective for the species to be anchored can be used to anchor the species to the solid surface.

[00227] 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, unreacted 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 or selective 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00228] Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence or absence of the test compound, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific or selective for one of the binding components to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific or selective 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.

[00229] 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 (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 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.

[00230] In yet another aspect, the 69583 or 85924 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 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; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with 69583 or 85924 ("69583 or 85924-binding proteins" or "69583 or 85924-bp") and are involved in 69583 or 85924 activity. Such 69583- or 85924-bps can be activators or inhibitors of signals by the 69583 or 85924 proteins or 69583 or 85924 targets as, for example, downstream elements of a 69583- or 85924-mediated signaling pathway.

[00231] 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 69583 or 85924 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- (Alternatively the: 69583 or 85924 protein can be the fused to the activator domain.) If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a 69583- or 85924-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
- 5 (e.g., lacZ) which 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 which encodes the protein which interacts with the 69583 or 85924 protein.
- [00232]** In another embodiment, modulators of 69583 or 85924 expression are
- 10 identified. For example, a cell or cell free mixture is contacted with a candidate compound and the expression of 69583 or 85924 mRNA or protein evaluated relative to the level of expression of 69583 or 85924 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. When expression of 69583 or 85924 mRNA or protein is greater in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is
- 15 identified as a stimulator of 69583 or 85924 mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of 69583 or 85924 mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of 69583 or 85924 mRNA or protein expression. The level of 69583 or 85924 mRNA or protein expression can be determined by methods
- 20 described herein for detecting 69583 or 85924 mRNA or protein.
- [00233]** 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 69583 or 85924 protein can be confirmed *in vivo*, e.g., in an animal such as a mouse
- 25 model for allergic airway disease (AAD) or inflammation and respiratory disorders e.g., chronic bronchitis, bronchial asthma, and bronchiectasis or hematopoietic disorders, e.g., leukemias.
- [00234]** 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
- 30 use an agent identified as described herein (e.g., a 69583 or 85924 modulating agent, an antisense 69583 or 85924 nucleic acid molecule, a 69583- or 85924-specific antibody, or a 69583- or 85924-binding partner) in an appropriate animal model to determine the efficacy, toxicity, side effects, or mechanism of action, of treatment with such an agent.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Furthermore, novel agents identified by the above-described screening assays can be used for treatments as described herein.

Detection Assays

- 5 [00235] 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 69583 or 85924 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.
- 10 Chromosome Mapping
- [00236] The 69583 or 85924 nucleotide sequences or portions thereof can be used to map the location of the 69583 or 85924 genes on a chromosome. This process is called chromosome mapping. Chromosome mapping is useful in correlating the 69583 or 85924 sequences with genes associated with disease.
- 15 [00237] Briefly, 69583 or 85924 genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp in length) from the 69583 or 85924 nucleotide sequences. 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 69583 or 85924 sequences will yield an amplified fragment.
- 20 [00238] 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).
- [00239] Other mapping strategies *e.g.*, in situ hybridization (described in Fan *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6223-27), pre-screening with labeled flow-sorted chromosomes, and pre-selection by hybridization to chromosome specific cDNA libraries can be used to map 69583 or 85924 to a chromosomal location.
- 25 [00240] 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.
- 30 Preferably 1,000 bases, and more preferably 2,000 bases will suffice to get good results at

WO 03/035840

PCT/US02/34037

a reasonable amount of time. For a review of this technique, see Verma *et al.* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York).

- [00241] 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 noncoding regions of the genes actually are 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.
- [00242] 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 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), described in, for example, Egeland *et al.* (1987) *Nature*, 325:783-787.
- [00243] Moreover, differences in the DNA sequences between individuals affected and unaffected with a disease associated with the 69583 or 85924 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.
- 25 Tissue Typing
- [00244] 69583 or 85924 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.
- 30 The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP (described in U.S. Patent 5,272,057).
- [00245] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

genome. Thus, the 69583 or 85924 nucleotide sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5' and 3' ends of the sequences. 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.

[00246] Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding 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 noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The noncoding sequences of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:4 can provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers which each yield a noncoding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences, such as those in SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:6 are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

[00247] If a panel of reagents from 69583 or 85924 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 69583 or 85924 Sequences in Forensic Biology

[00248] 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.

[00249] 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 base sequence information can be used for

WO 03/035840

PCT/US02/34037

identification as an accurate alternative to patterns formed by restriction enzyme generated fragments. Sequences targeted to noncoding regions of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4 (e.g., fragments derived from the noncoding regions of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4 having a length of at least 20 bases, preferably at least 30 bases) are particularly appropriate for this use.

[00250] The 69583 or 85924 nucleotide sequences described herein can further be used to provide polynucleotide reagents, e.g., labeled or labelable probes which can be used in, for example, an *in situ* hybridization technique, to identify a specific tissue. This can be very useful in cases where a forensic pathologist is presented with a tissue of unknown origin. Panels of such 69583 or 85924 probes can be used to identify tissue by species and/or by organ type.

[00251] In a similar fashion, these reagents, e.g., 69583 or 85924 primers or probes can be used to screen tissue culture for contamination (i.e. screen for the presence of a mixture of different types of cells in a culture).

15 Predictive Medicine

[00252] 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.

[00253] 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 which encodes 69583 or 85924.

[00254] Such disorders include, e.g., a disorder associated with the mis-expression of 69583 or 85924 gene; a disorder of the respiratory system.

[00255] The method includes one or more of the following:

25 [00256] detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation which affects the expression of the 69583 or 85924 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;

[00257] detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation

30 which alters the structure of the 69583 or 85924 gene;

[00258] detecting, in a tissue of the subject, the mis-expression of the 69583 or 85924 gene, at the mRNA level, e.g., detecting a non-wild type level of an mRNA;

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00259] 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 69583 or 85924 polypeptide.

[00260] In preferred embodiments the method includes: ascertaining the existence of at least one of: a deletion of one or more nucleotides from the 69583 or 85924 gene; an
 5 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.

[00261] For example, detecting the genetic lesion can include: (i) providing a probe/primer including an oligonucleotide containing a region of nucleotide sequence
 10 which hybridizes to a sense or antisense sequence from SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4, or naturally occurring mutants thereof or 5' or 3' flanking sequences naturally associated with the 69583 or 85924 gene; (ii) exposing the probe/primer to nucleic acid of the tissue; and detecting, by hybridization, *e.g.*, *in situ* hybridization, of the probe/primer to the nucleic acid, the presence or absence of the genetic lesion.

15 [00262] 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 69583 or 85924 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 69583 or 85924.

[00263] Methods of the invention can be used prenatally or to determine if a subject's
 20 offspring will be at risk for a disorder.

[00264] In preferred embodiments the method includes determining the structure of a 69583 or 85924 gene, an abnormal structure being indicative of risk for the disorder.

[00265] In preferred embodiments the method includes contacting a sample from the subject with an antibody to the 69583 or 85924 protein or a nucleic acid, which
 25 hybridizes specifically with the gene. These and other embodiments are discussed below.

Diagnostic and Prognostic Assays

[00266] The presence, level, or absence of 69583 or 85924 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
 30 69583 or 85924 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) that encodes 69583 or 85924 protein such that the presence of 69583 or 85924 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

a subject. A preferred biological sample is serum. The level of expression of the 69583 or 85924 gene can be measured in a number of ways, including, but not limited to: measuring the mRNA encoded by the 69583 or 85924 genes; measuring the amount of protein encoded by the 69583 or 85924 genes; or measuring the activity of the protein encoded by the 69583 or 85924 genes.

[00267] The level of mRNA corresponding to the 69583 or 85924 gene in a cell can be determined both by *in situ* and by *in vitro* formats.

[00268] 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, for example, a full-length 69583 or 85924 nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4, 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 69583 or 85924 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays are described herein.

[00269] 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 69583 or 85924 genes.

[00270] The level of mRNA in a sample that is encoded by one of 69583 or 85924 can be evaluated with nucleic acid amplification, *e.g.*, by rtPCR (Mullis (1987) U.S. Patent No. 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 (Lizardi *et al.*, U.S. Patent No. 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 5' or 3'

WO 03/035840

PCT/US02/34037

regions of a 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 flanked by the primers.

[00271] 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 69583 or 85924 gene being analyzed.

- 10 [00272] In another embodiment, the methods further contacting a control sample with a compound or agent capable of detecting 69583 or 85924 mRNA, or genomic DNA, and comparing the presence of 69583 or 85924 mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 69583 or 85924 mRNA or genomic DNA in the test sample.

- [00273] A variety of methods can be used to determine the level of protein encoded by 69583 or 85924. 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 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.

- [00274] The detection methods can be used to detect 69583 or 85924 protein in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. *In vitro* techniques for detection of 69583 or 85924 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), immunoprecipitations, immunofluorescence, enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), and Western blot analysis. *In vivo* techniques for detection of 69583 or 85924 protein include introducing into a subject a labeled anti-69583 or -85924 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

[00275] In another embodiment, the methods further include contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting 69583 or 85924 protein, and

WO 03/035840

PCT/US02/34037

comparing the presence of 69583 or 85924 protein in the control sample with the presence of 69583 or 85924 protein in the test sample.

[00276] The invention also includes kits for detecting the presence of 69583 or 85924 in a biological sample. For example, the kit can include a compound or agent capable of detecting 69583 or 85924 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 69583 or 85924 protein or nucleic acid.

[00277] 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.

[00278] 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 which can be 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.

[00279] The diagnostic methods described herein can identify subjects having, or at risk of developing, a disease or disorder associated with misexpressed or aberrant or unwanted 69583 or 85924 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.

[00280] In one embodiment, a disease or disorder associated with aberrant or unwanted 69583 or 85924 expression or activity is identified. A test sample is obtained from a subject and 69583 or 85924 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) is evaluated, wherein the level, *e.g.*, the presence or absence, of 69583 or 85924 protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant or unwanted 69583 or 85924 expression or activity. As

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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.

[00281] 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 with aberrant or unwanted 69583 or 85924 expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for respiratory disorders *e.g.*, chronic bronchitis, bronchial asthma, and bronchiectasis or hematopoietic disorders, *e.g.*, leukemias, proliferative and /or

5

10

differentiative disorders *e.g.*, carcinoma sarcoma.

[00282] The methods of the invention can also be used to detect genetic alterations in a 69583 or 85924 gene, thereby determining if a subject with the altered gene is at risk for a disorder characterized by mis-regulation in 69583 or 85924 protein activity or nucleic acid expression, such as respiratory disorders, lung disorders, proliferative and/or

15

pancreatic disorders colon disorders, breast disorders, skeletal muscle disorders, brain disorders, hypothalamic disorders, pituitary disorders, prostate disorders or cardiovascular disorders. 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

20

alteration affecting the integrity of a gene encoding a 69583 or 85924-protein, or the mis-expression of the 69583 or 85924 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 69583 or 85924 gene; 2) an addition of one or more nucleotides to a 69583 or 85924 gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of a 69583 or 85924

25

gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 69583 or 85924 gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 69583 or 85924 gene, 6) aberrant modification of a 69583 or 85924 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 69583 or 85924 gene, 8) a non-wild type level of a 69583- or 85924-protein, 9) allelic loss of a

30

69583 or 85924 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 69583- or 85924-protein.

[00283] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

69583 or 85924 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 69583 or 85924 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 69583 or 85924 gene (if present) occurs, 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 may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein. Alternatively, other amplification methods described herein or known in the art can be used.

[00284] In another embodiment, mutations in a 69583 or 85924 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 (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

[00285] In other embodiments, genetic mutations in 69583 or 85924 can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or RNA, two dimensional arrays, *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) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). For example, genetic mutations in 69583 or 85924 can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin, M.T. *et al. supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

- [00286] In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the 69583 or 85924 gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample 69583 or 85924 with the corresponding wild-type (control) sequence. Automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve *et al.* (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry.
- [00287] Other methods for detecting mutations in the 69583 or 85924 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) *Methods Enzymol.* 217:286-295).
- [00288] 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 69583 or 85924 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 No. 5,459,039).
- [00289] In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 69583 or 85924 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, see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; and Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control 69583 or 85924 nucleic acids will be denatured and allowed to renature. 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 preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex

WO 03/035840

PCT/US02/34037

molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

- [00290] In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing
 5 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 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and
 10 sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753).

[00291] 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* 86:6230).

- 15 [00292] Alternatively, allele specific amplification technology which 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) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3'
 20 end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition it may 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 performed using Taq ligase for amplification
 25 (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189-93). 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.

- [00293] The methods described herein can be performed, for example, by utilizing pre-
 30 packaged 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 69583 or 85924 gene.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Use of 69583 or 85924 Molecules as Surrogate Markers

[00294] The 69583 or 85924 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 69583 or 85924 molecules of the invention can be detected, and can be correlated with one or more biological states *in vivo*. For example, the 69583 or 85924 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 in the art include: Koomen *et al.* (2000) *J. Mass. Spectrom.* 35: 258-264; and James (1994) *AIDS Treatment News Archive* 209.

[00295] The 69583 or 85924 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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 *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

- 5 small amount of a drug can be sufficient to activate multiple rounds of marker (*e.g.*, a 69583 or 85924 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-69583 or 85924 antibodies can be employed in an
- 10 immune-based detection system for a 69583 or 85924 protein marker, or 69583- or 85924-specific radiolabeled probes can be used to detect a 69583 or 85924 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 in the art include: Matsuda *et al.* US
- 15 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; and Nicolau (1999) *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S16-S20.

- [00296] The 69583 or 85924 molecules of the invention are also useful as pharmacogenomic markers. As used herein, a "pharmacogenomic marker" is an
- 20 objective biochemical marker which correlates with a specific clinical drug response or susceptibility in a subject (see, *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
- 25 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.*, 69583 or 85924 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
- 30 presence or absence of a specific sequence mutation in 69583 or 85924 DNA can correlate with a 69583 or 85924 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Pharmaceutical Compositions

- [00297]** The nucleic acid and polypeptides, fragments thereof, as well as anti-69583 or -85924 antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions. Such 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.
- [00298]** 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.
- [00299]** 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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,

- 5 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 in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

- [00300] Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active
10 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 which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable
15 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.

- [00301] Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated
20 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 the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as
25 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 salicylate, or orange flavoring.

- 30 [00302] For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, *e.g.*, a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

[00303] Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means.

For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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 sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.
- [00304] 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.
- 10 [00305] 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.
- 15 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 with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.
- 20 [00306] 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.
- 25 [00307] 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 which exhibit high therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects can be used, care should be taken to design a
- 30

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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.

- [00308]** 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 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.
- 15 **[00309]** As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (i.e., an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, preferably about 0.01 to 25 mg/kg body weight, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg body weight, and even more preferably about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg, or 5 to 6 mg/kg body weight. The protein or polypeptide can be administered one time
- 20 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
- 25 subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody, unconjugated or conjugated as described herein, can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.
- [00310]** For antibodies, the preferred dosage is 0.1 mg/kg of body weight (generally 10
- 30 mg/kg to 20 mg/kg). If the antibody is to act in the brain, a dosage of 50 mg/kg to 100 mg/kg 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

and tissue penetration (*e.g.*, into the brain). A method for lipidation of antibodies is described by Cruikshank *et al.* ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14:193).

- [00311] The present invention encompasses agents which modulate expression or activity. An agent can, 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 heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds 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.
- [00312] 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 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 can, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is 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.

[00313] 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 5,328,470) or by stereotactic injection (see *e.g.*, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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

- 5 pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene delivery system.

[00314] The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Methods of Treatment:

- 10 **[00315]** 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 69583 or 85924 expression or activity. As used herein, the term "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
- 15 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. A therapeutic agent includes, but is not limited to, small molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.
- 20 **[00316]** 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 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
- 25 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 individual's prophylactic or therapeutic treatment with either the 69583 or 85924 molecules of the present invention or 69583 or 85924 modulators according to that
- 30 individual's drug response genotype. 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00317] In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition associated with an aberrant or unwanted 69583 or 85924 expression or activity, by administering to the subject a 69583 or 85924 or an agent which modulates 69583 or 85924 expression or at least one 69583 or 85924 activity. Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to by aberrant or unwanted 69583 or 85924 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 69583 or 85924 aberrance, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 69583 or 85924 aberrance, for example, a 69583 or 85924, 69583 or 85924 agonist or 69583 or 85924 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

[00318] It is possible that some 69583 or 85924 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.

[00319] The 69583 or 85924 molecules can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more of respiratory disorders, disorders associated with the lung, cellular proliferative and/or differentiative disorders, renal disorders, pancreatic disorders, disorders of the ovary, immune, *e.g.*, inflammatory disorders, colon disorders, breast disorders, skeletal muscle disorders, disorders of the brain, hypothalamic disorders, pituitary disorders, prostate disorders and cardiovascular disorders as described herein.

[00320] The molecules of the invention also can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more of disorders associated with bone metabolism, endothelial cell disorders, liver disorders, viral diseases, pain disorders and metabolic disorders.

[00321] Aberrant expression and/or activity of 69583 or 85924 molecules can mediate disorders associated with bone metabolism. "Bone metabolism" refers to direct or indirect effects in the formation or degeneration of bone structures, *e.g.*, bone formation, bone resorption, etc., which can ultimately affect the concentrations in serum of calcium and phosphate. This term also includes activities mediated by 69583 or 85924 molecules in bone cells, *e.g.* osteoclasts and osteoblasts, that can in turn result in bone formation and

WO 03/035840

PCT/US02/34037

degeneration. For example, 69583 or 85924 molecules can support different activities of bone resorbing osteoclasts such as the stimulation of differentiation of monocytes and mononuclear phagocytes into osteoclasts. Accordingly, 69583 or 85924 molecules that modulate the production of bone cells can influence bone formation and degeneration, and thus can be used to treat bone disorders. Examples of such disorders include, but are not limited to, osteoporosis, osteodystrophy, osteomalacia, rickets, osteitis fibrosa cystica, 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, malabsorption syndrome, steatorrhea, tropical sprue, idiopathic hypercalcemia and milk fever.

[00322] As used herein, an "endothelial cell disorder" includes a disorder characterized by aberrant, unregulated, or unwanted endothelial cell activity, *e.g.*, proliferation, migration, angiogenesis, or vascularization; or aberrant expression of cell surface adhesion molecules or genes associated with angiogenesis, *e.g.*, TIE-2, FLT and FLK. Endothelial cell disorders include tumorigenesis, tumor metastasis, psoriasis, diabetic retinopathy, endometriosis, Grave's disease, ischemic disease (*e.g.*, atherosclerosis), and chronic inflammatory diseases (*e.g.*, rheumatoid arthritis).

[00323] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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 can be useful for the early detection and treatment of liver injury associated with the administration of various chemicals or drugs, such as for
- 5 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.
- 10 **[00324]** Additionally, 69583 or 85924 molecules can play an important role in the etiology of certain viral diseases, including but not limited to Hepatitis B, Hepatitis C and Herpes Simplex Virus (HSV). Modulators of 69583 or 85924 activity could be used to control viral diseases. 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.
- 15 Also, 69583 or 85924 modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of virus-associated carcinoma, especially hepatocellular cancer.
- [00325]** Additionally, 69583 or 85924 can 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, cachexia, lipid disorders, and diabetes. Examples of
- 20 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; or
- 25 chest pain.
- [00326]** As discussed, successful treatment of 69583 or 85924 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
- 30 invention to prevent and/or ameliorate symptoms of 69583 or 85924 disorders. Such molecules can include, but are not limited to peptides, phosphopeptides, small organic or inorganic molecules, or antibodies (including, for example, polyclonal, monoclonal, humanized, human, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and Fab, F(ab)₂

WO 03/035840

PCT/US02/34037

and Fab expression library fragments, scFV molecules, and epitope-binding fragments thereof).

5 [00327] 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.

10 [00328] 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 15 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.

[00329] Another method by which nucleic acid molecules can be utilized in treating or preventing a disease characterized by 69583 or 85924 expression is through the use of 20 aptamer molecules specific for 69583 or 85924 protein. Aptamers are nucleic acid molecules having a tertiary structure which permits them to specifically or selectively bind to protein ligands (see, *e.g.*, Osborne *et al.* (1997) *Curr. Opin. Chem Biol.* 1: 5-9; and 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 25 molecules can be, aptamers offer a method by which 69583 or 85924 protein activity can be specifically decreased without the introduction of drugs or other molecules which can have pluripotent effects.

[00330] Antibodies can be generated that are both specific for target gene product and that reduce target gene product activity. Such antibodies can, therefore, by administered 30 in instances whereby negative modulatory techniques are appropriate for the treatment of 69583 or 85924 disorders. For a description of antibodies, see the Antibody section above.

[00331] In circumstances wherein injection of an animal or a human subject with a 69583 or 85924 protein or epitope for stimulating antibody production is harmful to the

WO 03/035840

PCT/US02/34037

subject, it is possible to generate an immune response against 69583 or 85924 through the use of anti-idiotypic antibodies (see, for example, Herlyn (1999) *Ann Med* 31:66-78; and Bhattacharya-Chatterjee and Foon (1998) *Cancer Treat Res.* 94:51-68). If an anti-idiotypic antibody is introduced into a mammal or human subject, it should stimulate the production of anti-anti-idiotypic antibodies, which should be specific to the 69583 or 85924 protein. Vaccines directed to a disease characterized by 69583 or 85924 expression can also be generated in this fashion.

[00332] 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 (see *e.g.*, Marasco *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893).

[00333] 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 69583 or 85924 disorders. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms of the disorders. Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures as described above.

[00334] 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 achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in

WO 03/035840

PCT/US02/34037

humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

- [00335] 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
- 5 created through molecular imprinting techniques. The compound which is able to modulate 69583 or 85924 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
- 10 which contains a repeated "negative image" of the compound and is able to selectively rebind the molecule under biological assay conditions. A detailed review of this technique can be seen in Ansell *et al* (1996) *Current Opinion in Biotechnology* 7:89-94 and in Shea (1994) *Trends in Polymer Science* 2:166-173. Such "imprinted" affinity matrixes are amenable to ligand-binding assays, whereby the immobilized monoclonal antibody
- 15 component is replaced by an appropriately imprinted matrix. An example of the use of such matrixes in this way can be seen 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 69583 or 85924 can be readily monitored and used in calculations of IC_{50} .
- 20 [00336] 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 fiberoptic devices, in turn allowing the dose in a test subject to be quickly optimized based on its individual IC_{50} . An rudimentary example of such a "biosensor" is
- 25 discussed in Kriz *et al* (1995) *Analytical Chemistry* 67:2142-2144.
- [00337] Another aspect of the invention pertains to methods of modulating 69583 or 85924 expression or activity for therapeutic purposes. Accordingly, in an exemplary embodiment, the modulatory method of the invention involves contacting a cell with a
- 30 69583 or 85924 or agent that modulates one or more of the activities of 69583 or 85924 protein activity associated with the cell. An agent that modulates 69583 or 85924 protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring target molecule of a 69583 or 85924 protein (*e.g.*, a 69583 or 85924 substrate or receptor), a 69583 or 85924 antibody, a 69583 or 85924 agonist or

WO 03/035840

PCT/US02/34037

antagonist, a peptidomimetic of a 69583 or 85924 agonist or antagonist, or other small molecule.

[00338] In one embodiment, the agent stimulates one or 69583 or 85924 activities.

5 Examples of such stimulatory agents include active 69583 or 85924 protein and a nucleic acid molecule encoding 69583 or 85924. In another embodiment, the agent inhibits one or more 69583 or 85924 activities. Examples of such inhibitory agents include antisense 69583 or 85924 nucleic acid molecules, anti-69583 or -85924 antibodies, and 69583 or 85924 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 10 subject). 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 69583 or 85924 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 15 regulates) 69583 or 85924 expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a 69583 or 85924 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 69583 or 85924 expression or activity. [00339] Stimulation of 69583 or 85924 activity is desirable in situations in which 69583 or 85924 is abnormally downregulated and/or in which increased 69583 or 85924 20 activity is likely to have a beneficial effect. For example, stimulation of 69583 or 85924 activity is desirable in situations in which a 69583 or 85924 is downregulated and/or in which increased 69583 or 85924 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of 69583 or 85924 activity is desirable in situations in which 69583 or 85924 is abnormally upregulated and/or in which decreased 69583 or 85924 activity is likely to 25 have a beneficial effect.

Pharmacogenomics

[00340] The 69583 or 85924 molecules of the present invention, as well as agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on 69583 or 85924 activity (e.g., 69583 or 85924 gene expression) as identified by a screening assay described herein can 30 be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) 69583- or 85924-associated disorders (e.g., regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division, aberrant or deficient proliferative and/or differentiative disorders e.g., carcinoma sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic

WO 03/035840

PCT/US02/34037

disorders, e.g., leukemias associated with aberrant or unwanted 69583 or 85924 activity. 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 69583 or 85924 molecule or 69583 or 85924 modulator as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with a 69583 or 85924 molecule or 69583 or 85924 modulator.

[00341] Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See, for example, Eichelbaum *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:983-985 and 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 haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

[00342] 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 can occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP can be involved in a disease

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- process, however, the vast majority can 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.
- [00343] 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 69583 or 85924 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.
- [00344] Alternatively, a method termed the "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 69583 or 85924 molecule or 69583 or 85924 modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.
- [00345] 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 69583 or 85924 molecule or 69583 or 85924 modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.
- [00346] 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 69583 or 85924 genes of the present invention, wherein these products can be associated with resistance of the cells to a therapeutic agent. Specifically, the activity of the proteins encoded by the 69583 or 85924 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.*, human cells, will become sensitive to treatment with an agent to which the unmodified target cells were resistant.
- [00347] Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs) on the expression or activity of a 69583 or 85924 protein can be applied in clinical trials. For example, the

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase 69583 or 85924 gene expression, protein levels, or upregulate 69583 or 85924 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 69583 or 85924 gene expression, protein levels, or downregulated 69583 or 85924 activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease 69583 or 85924 gene expression, protein levels, or downregulate 69583 or 85924 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 69583 or 85924 gene expression, protein levels, or upregulated 69583 or 85924 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 69583 or 85924 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disorder can be used as a "read out" or markers of the phenotype of a particular cell.

Other Embodiments

- [00348]** In another aspect, the invention features a method of analyzing a plurality of 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 69583 or 85924 or from a cell or subject in which a 69583 or 85924 mediated response has been elicited; contacting the array with a 69583 or 85924 nucleic acid (preferably purified), a 69583 or 85924 polypeptide (preferably purified), or an anti-69583 or -85924 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 the plurality, is detected, *e.g.*, by a signal generated from a label attached to the 69583 or 85924 nucleic acid, polypeptide, or antibody.
- [00349]** 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.
- [00350]** The method can include contacting the 69583 or 85924 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,

WO 03/035840

PCT/US02/34037

e.g., a wild type, normal, or non-diseased, non-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.

- 5 [00351] The plurality of capture probes can be a plurality of nucleic acid probes each of which specifically hybridizes, with an allele of 69583 or 85924. Such methods can be used to diagnose 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.
- 10 [00352] The method can be used to detect SNPs, as described above.
[00353] In another aspect, the invention features, a method of analyzing 69583 or 85924, *e.g.*, analyzing structure, function, or relatedness to other nucleic acid or amino acid sequences. The method includes: providing a 69583 or 85924 nucleic acid or amino acid sequence; comparing the 69583 or 85924 sequence with one or more preferably a
15 plurality of sequences from a collection of sequences, *e.g.*, a nucleic acid or protein sequence database; to thereby analyze 69583 or 85924.
[00354] The method can include evaluating the sequence identity between a 69583 or 85924 sequence and a database sequence. The method can be performed by accessing the database at a second site, *e.g.*, over the internet. Preferred databases include GenBank™
20 and SwissProt.
[00355] In another aspect, the invention features, a set of oligonucleotides, useful, *e.g.*, for identifying SNP's, or identifying specific alleles of 69583 or 85924. The set includes a plurality of oligonucleotides, each of which has a different nucleotide at an interrogation position, *e.g.*, an SNP or the site of a mutation. In a preferred embodiment, the
25 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 oligonucleotide which hybridizes to one allele provides a signal that is distinguishable from an oligonucleotides which hybridizes to a second allele.
[00356] The sequences of 69583 or 85924 molecules are provided in a variety of
30 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 69583 or 85924 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

not directly applicable to examining the nucleotide or amino acid sequences, or a subset thereof, as they exist in nature or in purified form.

[00357] A 69583 or 85924 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.

10 The medium is adapted or configured for having thereon 69583 or 85924 sequence information of the present invention.

[00358] 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.

[00359] 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 69583 or 85924 sequence information.

[00360] A variety of data storage structures are available to a skilled artisan for creating a computer readable medium having recorded thereon a 69583 or 85924 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 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

readable medium having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention.

- [00361] By providing the 69583 or 85924 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 is used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.
- 10 [00362] The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, wherein the method comprises the steps of determining 69583 or 85924 sequence information
- 15 associated with the subject and based on the 69583 or 85924 sequence information, determining whether the subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.
- [00363] The present invention further provides in an electronic system and/or in a
- 20 network, a method for determining whether a subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a disease associated with 69583 or 85924, wherein the method comprises the steps of determining 69583 or 85924 sequence information associated with the subject, and based on the 69583 or 85924 sequence information, determining whether the subject has a protein kinase-
- 25 associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-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
- 30 information associated with the subject.
- [00364] The present invention also provides in a network, a method for determining whether a subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving

WO 03/035840

PCT/US02/34037

69583 or 85924 sequence information from the subject and/or information related thereto, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to 69583 or 85924 and/or corresponding to a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, and based on one or
 5 more of the phenotypic information, the 69583 or 85924 information (e.g., sequence information and/or information related thereto), and the acquired information, determining whether the subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583 or 85924-associated disease or disorder. The method may further
 10 comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00365] The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583- or
 15 85924-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving information related to 69583 or 85924 (e.g., sequence information and/or information related thereto), receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network related to 69583 or 85924 and/or related to a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, and based
 20 on one or more of the phenotypic information, the 69583 or 85924 information, and the acquired information, determining whether the subject has a protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder or a pre-disposition to a protein kinase-associated or another 69583 or 85924-associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease,
 25 disorder, or pre-disease condition.

[00366] The invention also includes an array comprising a 69583 or 85924 sequence of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In one 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
 30 genes can be simultaneously assayed for expression, one of which can be 69583 or 85924. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

[00367] In addition to such qualitative information, the invention allows the quantitation of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- expression of a battery of genes in the tissue if 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 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 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.
- [00368] 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 protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, progression of protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder, and processes, such as a cellular transformation associated with the protein kinase-associated or another 69583- or 85924-associated disease or disorder.
- [00369] 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 69583 or 85924 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.
- [00370] 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 69583 or 85924) that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.
- [00371] 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

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- 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.
- 5 [00372] 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).
- 10 [00373] Thus, the invention features a method of making a computer readable record of a sequence of a 69583 or 85924 sequence which includes recording the sequence on a computer readable matrix. In a preferred embodiment the record includes one or more of the following: 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.
- 15 [00374] In another aspect, the invention features a method of analyzing a sequence. The method includes: providing a 69583 or 85924 sequence, or record, in computer readable form; comparing a second sequence to the 69583 or 85924 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 69583 or 85924 sequence includes a sequence being compared. In a preferred
- 20 embodiment the 69583 or 85924 or second sequence is stored 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 69583 or 85924 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
- 25 more of the following: 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.
- 30

WO 03/035840

PCT/US02/34037

[00375] This invention is further illustrated by the following exemplification, which should not be construed as limiting.

EXEMPLIFICATION

5 Gene Expression Analysis

[00376] 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 10 38 PCR amplification cycles to reach a threshold level of fluorescence using β -2 microglobulin as an internal 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 SUPERScript™ Choice System following the manufacturer's instructions (GibcoBRL). A 15 negative control of RNA without reverse transcriptase was mock reverse transcribed for each RNA sample.

[00377] Human 69583 and 85924 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.

20 [00378] Probes were designed by PrimerExpress software (PE Biosystems) based on the sequence of the human 69583 and 85924 genes. Each human 69583 and 85924 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 25 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 30 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

- [00379] The following method was used to quantitatively calculate human 69583 and 85924 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 69583 and 85924 gene is normalized by subtracting the Ct value of the β -2 microglobulin gene to obtain a Δ Ct value using the following formula: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{human 59914 and 59921}} - \text{Ct}_{\beta\text{-2 microglobulin}}$. Expression is then calibrated against a cDNA sample showing a comparatively low level of expression of the human 69583 and 85924 gene. The Δ Ct value for the calibrator sample is then subtracted from Δ Ct for each tissue sample according to the following formula: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{sample}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrator}}$. Relative expression is then calculated using the arithmetic formula given by $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Expression of the target human 69583 and 85924 gene in each of the tissues tested is then graphically represented as discussed in more detail below.
- [00380] The results indicate significant 69583 expression in normal kidney, normal pancreas, lung tumor and ovarian tumor samples, as well as moderate expression in colon tumor and breast tumor samples. The results additionally indicate significant 85924 expression in normal pancreas, normal skeletal muscle, normal brain cortex, normal hypothalamus, normal pituitary glands, prostate tumor, lung tumor and congestive heart failure samples.
- [00381] The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are incorporated herein by reference.

Equivalents

- [00382] 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.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

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
 5 70% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID
 NO:4 or SEQ ID NO:6;
 - b. a nucleic acid molecule comprising a fragment of at least 5350 nucleotides of
 the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:4 or at least 4180
 nucleotides of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:6;
 - 10 c. a nucleic acid molecule which encodes a polypeptide comprising the amino
 acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5; and
 - d. a nucleic acid molecule which encodes a naturally occurring allelic variant of
 a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5,
 wherein the nucleic acid molecule hybridizes to a nucleic acid molecule comprising
 15 SEQ ID NO:1, 3, 4 or 6, or a complement thereof, under stringent conditions.
2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which is at least 80% identical to the
 nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID
 20 NO:6.
3. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, which is at least 90% identical to the
 nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID
 NO:6.
- 25 4. 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, SEQ ID
 NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6; and
 - b. a nucleic acid molecule which encodes a polypeptide comprising the amino
 30 acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5.
5. The nucleic acid molecule of claim 1 further comprising vector nucleic acid
 sequences.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

6. The nucleic acid molecule of claim 1 further comprising nucleic acid sequences encoding a heterologous polypeptide.
7. A host cell which contains the nucleic acid molecule of claim 1.
8. The host cell of claim 7 which is a mammalian host cell.
9. A non-human mammalian host cell containing the nucleic acid molecule of claim 1.
10. 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 70% identical to a nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, or a complement thereof; and
 - 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, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6.
11. The isolated polypeptide of claim 10 comprising 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, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, or a complement thereof.
12. The isolated polypeptide of claim 10 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, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, or a complement thereof.
13. The isolated polypeptide of claim 10 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5.
14. The polypeptide of claim 10 further comprising heterologous amino acid sequences.

WO 03/035840

PCT/US02/34037

15. An antibody which selectively binds to a polypeptide of claim 10.
16. The antibody of claim 15, which is a monoclonal antibody.
- 5 17. The antibody of claim 16, comprising an immunologically active portion selected from the group consisting of:
- a. an scFV fragment;
 - b. a dcFV fragment;
 - c. an Fab fragment; and
 - 10 d. an F(ab')₂ fragment.
18. The antibody of claim 16, wherein the antibody is selected from the group consisting of:
- a. a chimeric antibody;
 - 15 b. a humanized antibody;
 - c. a human antibody;
 - d. a non-human antibody; and
 - e. a single chain antibody.
- 20 19. A method for producing a polypeptide selected from the group consisting of:
- a. a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5; and
 - b. a naturally occurring allelic variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, wherein the polypeptide is encoded
 - 25 by a nucleic acid molecule which hybridizes to a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO:6, or a complement thereof under stringent conditions;
 - comprising culturing the host cell of claim 7 under conditions in which the nucleic acid molecule is expressed.
 - 30
20. A method for detecting the presence of a polypeptide of claim 10 in a sample, comprising:
- contacting the sample with a compound which selectively binds to a polypeptide of claim 10; and

WO 03/035840

PCT/US02/34037

determining whether the compound binds to the polypeptide in the sample.

21. The method of claim 20, wherein the compound which binds to the polypeptide is an antibody.

5

22. A kit comprising a compound which selectively binds to a polypeptide of claim 10 and instructions for use.

23. 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
determining whether the nucleic acid probe or primer binds to a nucleic acid molecule in the sample.

10

24. The method of claim 23, wherein the sample comprises mRNA molecules and is contacted with a nucleic acid probe.

15

25. A kit comprising a compound which selectively hybridizes to a nucleic acid molecule of claim 1 and instructions for use.

20

26. A method for identifying a compound which binds to a polypeptide of claim 10 comprising the steps of:
contacting a polypeptide, or a cell expressing a polypeptide of claim 12 with a test compound; and
determining whether the polypeptide binds to the test compound.

25

27. The method of claim 26, 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
c. detection of binding using an assay for 69583 or 85924-mediated signal transduction.

30

WO 03/035840

PCT/US02/34037

28. A method for modulating the activity of a polypeptide of claim 10 comprising contacting a polypeptide or a cell expressing a polypeptide of claim 10 with a compound which binds to the polypeptide in a sufficient concentration to modulate the activity of the polypeptide.

5

29. A method for identifying a compound which modulates the activity of a polypeptide of claim 10, comprising:

contacting a polypeptide of claim 10 with a test compound; and

determining the effect of the test compound on the activity of the polypeptide to
10 thereby identify a compound which modulates the activity of the polypeptide

WO 03/035840

PCT/US02/34037

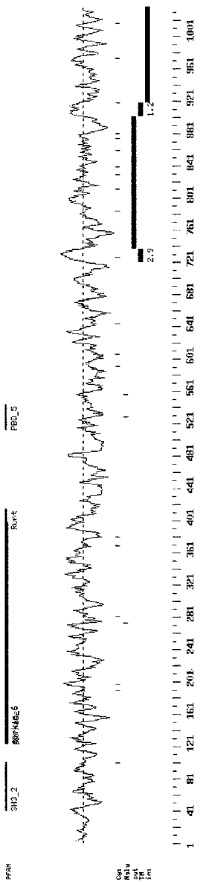


FIGURE 1

WO 03/035840

PCT/US02/34037

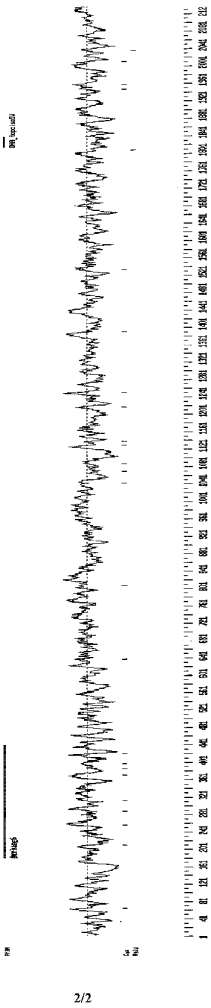


FIGURE 2

WO 03/035840

PCT/US02/34037

SEQUENCE LISTING

<110> Millennium Pharmaceuticals, Inc.
Kapeller-Libermann, Rosana
Spurling, Heidi L.

<120> 69583 AND 85924, NOVEL HUMAN PROTEIN
KINASE FAMILY MEMBERS AND USES THEREFOR

<130> MPI01-278

<150> US 60/338,690

<151> 2001-10-24

<160> 13

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5549

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(3111)

```

<400> 1
atg gct ttg cgg ggc gcc gcg gga gcg acc gac acc cgg gtg tcc tcg 48
Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val Ser Ser
1 5 10 15

gcc ggg gga gcc ccc ggc gcc tca gcg tcc tcg tcg tcc acc tcc tcg 96
Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser Thr Ser Ser
20 25 30

ggc gcc tcg gcc tcg gcg gcc gcg ggg ctg tgg gcc gcg ctc tat gac 144
Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu Trp Ala Ala Leu Tyr Asp
35 40 45

tac gag gct cgc ggc gag gac gag ctg agc ctg cgg cgc gcc cag ctg 192
Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu
50 55 60

gtg gag gtg ctg tcg cag gac gcc gcc gtg tcg ggc gac gag gcc tgg 240
Val Glu Val Leu Ser Gln Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp
65 70 75 80

tgg gca ggc cag gtg cag cgg cgc ctc ggc atc ttc ccc gcc aac tac 288
Trp Ala Gly Gln Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr
85 90 95

gtg gct ccc tgc cgc cgg gcc gcc agc ccc gcg ccg ccg ccc tcg cgg 336
Val Ala Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg
100 105 110

ccc agc tcc ccg gta cac gtc gcc ttc gag cgg ctg gag ctg aag gag 384
Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu Lys Glu
115 120 125

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

ctc atc ggc gct ggg ggc ttc ggg cag gtg tac cgc gcc acc tgg cag 432
Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg Ala Thr Trp Gln
130 135 140

ggc cag gag gtg gcc gtg aag gcg gcg cgc cag gac ccg gag cag gac 480
Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg Gln Asp Pro Glu Gln Asp
145 150 155 160

gcg gcg gcg gct gcc gag agc gtg cgg cgc gag gct cgg ctc ttc gcc 528
Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala
165 170 175

atg ctg cgg cac ccc aac atc atc gag ctg cgc gcc gtg tgc ctg cag 576
Met Leu Arg His Pro Asn Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln
180 185 190

cag cgc cac ctc tgc ctg gtg ctg gag ttc gcc cgc gcc gga gcg ctc 624
Gln Pro His Leu Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu
195 200 205

aac cga gcg ctg gcc gct gcc aac gcc gcc cgc gac ccg cgc gcg ccc 672
Asn Arg Ala Leu Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
210 215 220

ggc ccc cgc cgc gcg cgc cgc atc cct cgc cac gtg ctg gtc aac tgg 720
Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val Asn Trp
225 230 235 240

gcc gtg cag ata gcg cgg gcc atg ctc tac ctg cat gag gag gcc ttc 768
Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His Glu Glu Ala Phe
245 250 255

gtg ccc atc ctg cac cgg gac ctc aag tcc agc aac att ttg cta ctt 816
Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Leu
260 265 270

gag aag ata gaa cat gat gac atc tgc aat aaa act ttg aag att aca 864
Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr
275 280 285

gat ttt ggg ttg gcg agg gaa tgg cac agg acc acc aaa atg agc aca 912
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr
290 295 300

gca gcc acc tat gcc tgg atg gcc ccc gaa gtg atc aag tct tcc ttg 960
Ala Gly Thr Tyr Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu
305 310 315 320

ttt tct aag gga agc gac atc tgg agc tat gga gtg ctg ctg tgg gaa 1008
Phe Ser Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
325 330 335

ctg ctc acc gga gaa gtc ccc tat cgg gcc att gat gcc ctc gcc gtg 1056
Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu Ala Val
340 345 350

gct tat ggg gta gca gtc aat aaa ctc act ttg ccc att cca tcc acc 1104
Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro Ile Pro Ser Thr
355 360 365

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

tgc cct gag ccg ttt gcc aag ctc atg aaa gaa tgc tgg caa caa gac Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Gln Gln Asp 370 375 380	1152
cct cat att cgt cca tcg ttt gcc tta att ctc gaa cag ttg act gct Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala 385 390 395 400	1200
att gaa ggg gca gtg atg act gag atg cct caa gaa tct ttt cat tcc Ile Glu Gly Ala Val Met Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser 405 410 415	1248
atg caa gat gac tgg aaa cta gaa att caa caa atg ttt gat gag ttg Met Gln Asp Asp Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu 420 425 430	1296
aga aca aag gaa aag gag ctg cga tcc cgg gaa gag gag ctg act cgg Arg Thr Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg 435 440 445	1344
gcg gct ctg cag cag aag tct cag gag gag ctg cta aag cgg cgt gag Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu 450 455 460	1392
cag cag ctg gca gag cgc gag atc gac gtg ctg gag cgg gaa ctt aac Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu Arg Glu Leu Asn 465 470 475 480	1440
att ctg ata ttc cag cta aac cag gag aag ccc aag gta aag aag agg Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys Pro Lys Val Lys Lys Arg 485 490 495	1488
aag ggc aag ttt aag aga agt cgt tta aag ctc aaa gat gga cat cga Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg 500 505 510	1536
atc agt tta cct tca gat ttc cag cac aag ata acc gtg cag gcc tct Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser 515 520 525	1584
ccc aac ttg gac aaa cgg cgg agc ctg aac agc agc agt tcc agt ccc Pro Asn Leu Asp Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro 530 535 540	1632
ccg agc agc ccc aca atg atg ccc cga ctc cga gcc ata cag ttg act Pro Ser Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr 545 550 555 560	1680
tca gat gaa agc aat aaa act tgg gga agg aac aca gtc ttt cga caa Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe Arg Gln 565 570 575	1728
gaa gaa ttt gag gat gta aaa agg aat ttt aag aaa aaa ggt tgt acc Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys Lys Gly Cys Thr 580 585 590	1776
tgg gga cca aat tcc att caa atg aaa gat aga aca gat tgc aaa gaa Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp Arg Thr Asp Cys Lys Glu 595 600 605	1824
agg ata aga cct ctc tcc gat ggc aac agt cct tgg tca act atc tta	1872

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu	
610 615 620	
ata aaa aat cag aaa acc atg ccc ttg gct tca ttg ttt gtg gac cag	1920
Ile Lys Asn Gln Lys Thr Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln	
625 630 635 640	
cca ggg tcc tgt gaa gag cca aaa ctt tcc cct gat gga tta gaa cac	1968
Pro Gly Ser Cys Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His	
645 650 655	
aga aaa cca aaa caa ata aaa ttg cct agt cag gcc tac att gat cta	2016
Arg Lys Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu	
660 665 670	
cct ctt ggg aaa gat gct cag aga gag aat cct gca gaa gct gaa agc	2064
Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala Glu Ser	
675 680 685	
tgg gag gag gca gcc tct gcg aat gct gcc aca gtc tcc att gag atg	2112
Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val Ser Ile Glu Met	
690 695 700	
act cct acg aat agt ctg agt aga tcc ccc cag aga aag aaa acg gag	2160
Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro Gln Arg Lys Lys Thr Glu	
705 710 715 720	
tca gct ctg tat ggg tgc acc atc ctt ctg gca tgc gtg gct ctg gga	2208
Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Ile Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly	
725 730 735	
ctg gac ctc aga gat ctt cat aaa gca cag gct gct gaa gaa ccg ttg	2256
Leu Asp Leu Arg Asp Leu His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu	
740 745 750	
ccc aag gaa gag aag aag aaa cga gag gga atc ttc cag cgg gct tcc	2304
Pro Lys Glu Glu Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser	
755 760 765	
aag tcc cgc aga agt gcc agt cct ccc aca agc ctg cca tcc acc ggt	2352
Lys Ser Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Gly	
770 775 780	
ggg gag gcc agc agc cca ccc tcc ctg cca ctg tca agt gcc ctg ggc	2400
Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala Leu Gly	
785 790 795 800	
atc ctc tcc aca cct tct ttc tcc aca aag tgc ctg ctg cag atg gac	2448
Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu Leu Gln Met Asp	
805 810 815	
agt gaa gat cca ctg gtg gac agt gca cct gtc act tgt gac tct gag	2496
Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro Val Thr Cys Asp Ser Glu	
820 825 830	
atg ctc act ccg gat ttt tgt ccc act gcc cca gga agt ggt cgt gag	2544
Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu	
835 840 845	
cca gcc ctc atg cca aga ctt gac act gat tgt agt gta tca aga aac	2592
Pro Ala Leu Met Pro Arg Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn	

WO 03/035840

PCT/US02/34037

850	855	860	
ttg ccg tct tcc ttc cta	cag cag aca tgt ggg aat gta cct tac tgt		2640
Leu Pro Ser Ser Phe Leu	Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys		
865	870	875	880
gct tct tca aaa cat aga	ccg tca cat cac aga cgg acc atg tct gat		2688
Ala Ser Ser Lys His Arg	Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp		
885	890	895	
gga aat ccg acc cca act	ggt gca act att atc tca gcc act gga gcc		2736
Gly Asn Pro Thr Pro Thr	Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr Gly Ala		
900	905	910	
tct gca ctg cca etc tgc	ccc tca cct gct cct cac agt cat ctg cca		2784
Ser Ala Leu Pro Leu Cys	Pro Ser Pro Ala Pro His Ser His Leu Pro		
915	920	925	
agg gag gtc tca ccc aag	aag cac agc act gtc cac atc gtg cct cag		2832
Arg Glu Val Ser Pro Lys	Lys His Ser Thr Val His Ile Val Pro Gln		
930	935	940	
cgt cgc cct gcc tcc ctg	aga agc cgc tca gat ctg cct cag gct tac		2880
Arg Arg Pro Ala Ser Leu	Arg Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr		
945	950	955	960
cca cag aca gca gtg tct	cag ctg gca cag act gcc tgt gta gtg ggt		2928
Pro Gln Thr Ala Val Ser	Gln Leu Ala Thr Ala Cys Val Val Gly		
965	970	975	
cgc cca gga cca cat ccc	acc caa ttc ctc gct gcc aag gag aga act		2976
Arg Pro Gly Pro His Pro	Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr		
980	985	990	
aaa tcc cat gtg cct tca	tta ctg gat gct gac gtg gaa ggt cag agc		3024
Lys Ser His Val Pro Ser	Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser		
995	1000	1005	
agg gac tac act gtg cca	ctg tgc aga atg agg agc aaa acc agc cgg		3072
Arg Asp Tyr Thr Val Pro	Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr Ser Arg		
1010	1015	1020	
cca tct ata tat gaa ctg	gag aaa gaa ttc ctg tct taa actaagtgcc		3121
Pro Ser Ile Tyr Glu Leu	Glu Glu Lys Glu Phe Leu Ser *		
1025	1030	1035	
ttactgttgt ttaagcatttt	ttttaagggtg aacaaatgaa cacaatgtat ctacctttga		3181
actgtttcat gctgctgtgt	tttcaaaagc tgtggccatg ttctaaaatt agtaagatat		3241
atccagcttc tcaaaaaaatg	tatatgattg ctgttagcca tgtctattgt ttttccctcg		3301
gattcttttc ttataacttg	gaatacacaa aagtgtaaaa caagagatgt gcaccaatga		3361
aaactatgct gggtcgaatt	accttcagca caatgttaat gttttcgttc tcatttatgc		3421
ctttgtccat ttgcacacaa	cagaaaattgt aatgagcttc actatttttg tttcttttcc		3481
tccttttttt tcttttttcc	tttcttttcc ttttctgttc ttgtttcttg ttttttttbc		3541
ttgtagtctc tttttttaat	ttgtcatttt gcaacaaaaa gccaagaaag agcttttagtc		3601
tcctggcaag aataatgtga	tattagtaag taaaggctct taaaagtcctg atgactggaa		3661
tagatataaa gtccgtttta	aactacctaa ccttggcctgt gggccgataa tgcataatgc		3721
cagttctcac ttaaattatg	caatgatatt tcttctctgag gaaattatac ggaatgtaac		3781
ttataaaagc ttactgaat	ataagttata agcattttat tcattagaac tccaaaaatg		3841
atgttcaaaag ttacgtcctt	gccatttgac tgagaccaca tgggtgtgccc cttgagtgag		3901
gctaattcttt aggtttttcc	tatagaaaac gttcttcttc catcagtagc cctttatttg		3961
atatttcagaa gtggaagct	ttttcattct ccagtagaac ttttaaaaaat tgttacagat		4021

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

acctagctct tcacagatat catgtattgt aaacagtcac gtgtcttaac tttattttct 4081
ctatttgagt gcataattat cctaataatc ccaagacac tgacaactca aggaacagca 4141
gtacagctact attagaaggt aagtatgttg ttgttatbtt acatttcatt taattgtgga 4201
taaatgttag acatctgttg aataaagctc atatggtgga aacgacaact atattatgaa 4261
ttattttcag aaatggatct ttgaatagca gatcaggatt taaataataa aattatctat 4321
gaatcacttt tatgtgcata catatatgat acaaatccag agttattggt gcagaaatgg 4381
ctaccgcaga gcttggtaaa ttgccttggt ttctttagt taaatgtatt gtgtctccct 4441
tctgtctcta gaatgtggtc cttcagaaga cagacaattg acatttaaat tttcccaaac 4501
aatgaaaaac taaattaaaa acattgcttg atatttcatt taaaattgca ccttgcttaa 4561
ggtttactga ataactgaaa tgcagcaat ttaaaataaa ttcaattgtg tgataaaata 4621
tctcaccctat aatagaagaa aaggaaaatc atattatttg gcaattttgc agcattgtgg 4681
ttgcctaaca ggtatatcca gcagatgaga aacagtatga aaggattgta ttaacatggt 4741
aagttttgcc ctaaggaaaa cgatcttgca ttctggatc ttgcagcaaa gtctcaggta 4801
cttaatacgt tttctgtgtt tatcatctgt tctatgattc ggcttcactt tgggtggtta 4861
ttgaattatg taacagagat ttgtgtttcc aaaaatgta tcacatttga aactatgatt 4921
gctttgtgtt cagtcctttt ggaacacgta gctccagct taagggtaga ggaatatata 4981
acctaaaaac atcaatacat gaagaaaaaa ggaatgaaac tatgtcctca gtttacttc 5041
taccaaaaaa tccctgtatg ttgtgtgcatg tatgttggcg ttgtgtgtg tgcatgcata 5101
ttagtaaatg ttgtgttgca ttgtgtgtgt ggggagtgta ttgtatctgg gtgtgtgtt 5161
atctctgtta ttatccctc ttatgtttat tttaagcaac tctacattat gatgaatttc 5221
aaatgaagc tgtattaaaa taattgtaat ataacaattc aatctcacat gttactgcag 5281
atagttaact ttgtctgcaa tctattgtac atttgcaatt ttctgtgtta gtaaacctag 5341
cagaactctg ttattttatt ttgtgtaggc ttaattgtca ctgaagata agtcaattac 5401
tgtagtaaaa aaattaaggt actctcactg cagagattta aggcctgggc ctaatgtgct 5461
gtattatgaa gctttgtgac tgaaaaatat gtttacatag gttgtctatt tttttaataa 5521
acttttatag ctgtctctat tgctcagt 5549

```

<210> 2
 <211> 1036
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

```

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

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val Asn Trp
 225 230 235 240
 Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His Glu Glu Ala Phe
 245 250 255
 Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Leu
 260 265 270
 Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr
 275 280 285
 Asp Phe Gly Leu Ala Arg Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr
 290 295 300
 Ala Gly Thr Tyr Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Ser Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
 325 330 335
 Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu Ala Val
 340 345 350
 Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro Ile Pro Ser Thr
 355 360 365
 Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Gln Gln Asp
 370 375 380
 Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala
 385 390 395 400
 Ile Glu Gly Ala Val Met Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser
 405 410 415
 Met Gln Asp Asp Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu
 420 425 430
 Arg Thr Lys Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
 435 440 445
 Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu
 450 455 460
 Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu Arg Glu Leu Asn
 465 470 475 480
 Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys Pro Lys Val Lys Lys Arg
 485 490 495
 Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg
 500 505 510
 Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser
 515 520 525
 Pro Asn Leu Asp Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro
 530 535 540
 Pro Ser Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr
 545 550 555 560
 Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe Arg Gln
 565 570 575
 Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys Lys Gly Cys Thr
 580 585 590
 Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp Arg Thr Asp Cys Lys Glu
 595 600 605
 Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu
 610 615 620
 Ile Lys Asn Gln Lys Thr Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln
 625 630 635 640
 Pro Gly Ser Cys Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His
 645 650 655
 Arg Lys Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu
 660 665 670
 Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala Glu Ser
 675 680 685
 Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val Ser Ile Glu Met
 690 695 700
 Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro Gln Arg Lys Lys Thr Glu

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

705              710              715              720
Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Ile Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly
              725              730              735
Leu Asp Leu Arg Asp Leu His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu
              740              745              750
Pro Lys Glu Glu Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Gln Arg Ala Ser
              755              760              765
Lys Ser Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Gly
              770              775              780
Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala Leu Gly
              785              790              795
Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu Leu Gln Met Asp
              800              805              810
Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro Val Thr Cys Asp Ser Glu
              815              820              825
Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu
              830              835              840
Pro Ala Leu Met Pro Arg Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn
              845              850              855
Leu Pro Ser Ser Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys
              860              865              870
Ala Ser Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp
              875              880              885
Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr Gly Ala
              890              895              900
Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His Ser His Leu Pro
              905              910              915
Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr Val His Ile Val Pro Gln
              920              925              930
Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr
              935              940              945
Pro Gln Thr Ala Val Ser Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly
              950              955              960
Arg Pro Gly Pro His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr
              965              970              975
Lys Ser His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser
              980              985              990
Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr Ser Arg
              995              1000              1005
Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser
              1010              1015              1020
1025              1030              1035

<210> 3
<211> 3111
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(3111)

<400> 3
atg gct ttg cgg ggc gcc gcg gga gcg acc gac acc ccg gtg tcc tcg 48
Met Ala Leu Arg Gly Ala Ala Gly Ala Thr Asp Thr Pro Val Ser Ser
1 5 10 15

gcc ggg gga gcc ccc ggc ggc tca gcg tcc tcg tcg tcc acc tcc tcg 96
Ala Gly Gly Ala Pro Gly Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser
20 25 30

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

ggc ggc tgc gcc tgc gcg gcc gcg ggg ctg tgg gcc gcg ctc tat gac 144
Gly Gly Ser Ala Ser Ala Gly Ala Gly Leu Trp Ala Ala Leu Tyr Asp
35 40 45

tac gag gct cgc gcc gag gac gag ctg agc ctg cgg cgc gcc cag ctg 192
Tyr Glu Ala Arg Gly Glu Asp Glu Leu Ser Leu Arg Arg Gly Gln Leu
50 55 60

gtg gag gtg ctg tgc cag gac gcc gcc gtg tgc gcc gac gag gcc tgg 240
Val Glu Val Leu Ser Gln Asp Ala Ala Val Ser Gly Asp Glu Gly Trp
65 70 75 80

tgg gca gcc cag gtg cag cgg cgc ctc gcc atc ttc ccc gcc aac tac 288
Trp Ala Gly Gln Val Gln Arg Arg Leu Gly Ile Phe Pro Ala Asn Tyr
85 90 95

gtg gct ccc tgc cgc ccg gcc gcc agc ccc gcg ccg ccg ccc tgc cgg 336
Val Ala Pro Cys Arg Pro Ala Ala Ser Pro Ala Pro Pro Pro Ser Arg
100 105 110

ccc agc tcc ccg gta cac gtc gcc ttc gag cgg ctg gag ctg aag gag 384
Pro Ser Ser Pro Val His Val Ala Phe Glu Arg Leu Glu Leu Lys Glu
115 120 125

ctc atc gcc gct ggg gcc ttc ggg cag gtg tac cgc gcc acc tgg cag 432
Leu Ile Gly Ala Gly Gly Phe Gly Gln Val Tyr Arg Ala Thr Trp Gln
130 135 140

ggc cag gag gtg gcc ctg aag gcg gcg cgc cag gac ccg gag cag gac 480
Gly Gln Glu Val Ala Val Lys Ala Ala Arg Gln Asp Pro Glu Gln Asp
145 150 155 160

gcg gcg gcg gct gcc gag agc gtg cgg cgc gag gct cgg ctc ttc gcc 528
Ala Ala Ala Ala Ala Glu Ser Val Arg Arg Glu Ala Arg Leu Phe Ala
165 170 175

atg ctg cgg cac ccc aac atc atc gag ctg cgc gcc gtg tgc ctg cag 576
Met Leu Arg His Pro Asn Ile Ile Glu Leu Arg Gly Val Cys Leu Gln
180 185 190

cag ccg cac ctc tgc ctg gtg ctg gag ttc gcc cgc gcc gga gcg ctc 624
Gln Pro His Leu Cys Leu Val Leu Glu Phe Ala Arg Gly Gly Ala Leu
195 200 205

aac cga gcg ctg gcc gct gcc aac gcc gcc ccg gac ccg cgc gcg ccc 672
Asn Arg Ala Leu Ala Ala Ala Asn Ala Ala Pro Asp Pro Arg Ala Pro
210 215 220

ggc ccc cgc cgc gcg cgc cgc atc cct ccg cac gtg ctg gtc aac tgg 720
Gly Pro Arg Arg Ala Arg Arg Ile Pro Pro His Val Leu Val Asn Trp
225 230 235 240

gcc gtg cag ata gcg cgg gcc atg ctc tac ctg cat gag gag gcc ttc 768
Ala Val Gln Ile Ala Arg Gly Met Leu Tyr Leu His Glu Glu Ala Phe
245 250 255

gtg ccc atc ctg cac cgg gac ctc aag tcc agc aac att ttg cta ctt 816
Val Pro Ile Leu His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Leu Leu
260 265 270

gag aag ata gaa cat gat gac atc tgc aat aaa act ttg aag att aca 864

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Glu Lys Ile Glu His Asp Asp Ile Cys Asn Lys Thr Leu Lys Ile Thr
275                               280                               285

gat ttt ggg ttg gcg agg gaa tgg cac agg acc acc aaa atg agc eca 912
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Glu Trp His Arg Thr Thr Lys Met Ser Thr
290                               295                               300

gca ggc acc tat gcc tgg atg gcc ccc gaa gtg atc aag tct tcc ctg 960
Ala Gly Thr Tyr Ala Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Lys Ser Ser Leu
305                               310                               315                               320

ttt tct aag gga agc gac atc tgg agc tat gga gtg ctg ctg tgg gaa 1008
Phe Ser Lys Gly Ser Asp Ile Trp Ser Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu
325                               330                               335

ctg ctc acc gga gaa gtc ccc tat cgg ggc att gat ggc ctc gcc gtg 1056
Leu Leu Thr Gly Glu Val Pro Tyr Arg Gly Ile Asp Gly Leu Ala Val
340                               345                               350

gct tat ggg gta gca gtc aat aaa ctc act ttg ccc att cca tcc acc 1104
Ala Tyr Gly Val Ala Val Asn Lys Leu Thr Leu Pro Ile Pro Ser Thr
355                               360                               365

tgc cct gag ccg ttt gcc aag ctc atg aaa gaa tgc tgg caa caa gac 1152
Cys Pro Glu Pro Phe Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Gln Gln Asp
370                               375                               380

cct cat att cgt cca tcg ttt gcc tta att ctc gaa cag ttg act gct 1200
Pro His Ile Arg Pro Ser Phe Ala Leu Ile Leu Glu Gln Leu Thr Ala
385                               390                               395                               400

att gaa ggg gca gtg atg act gag atg cct caa gaa tct ttt cat tcc 1248
Ile Glu Gly Ala Val Met Thr Glu Met Pro Gln Glu Ser Phe His Ser
405                               410                               415

atg caa gat gac tgg aaa cta gaa att caa caa atg ttt gat gag ttg 1296
Met Gln Asp Asp Trp Lys Leu Glu Ile Gln Gln Met Phe Asp Glu Leu
420                               425                               430

aga aca aag gaa aag gag ctg cga tcc cgg gaa gag gag ctg act cgg 1344
Arg Thr Lys Glu Lys Glu Leu Arg Ser Arg Glu Glu Glu Leu Thr Arg
435                               440                               445

gcg gct ctg cag cag aag tct cag gag gag ctg cta aag cgg cgt gag 1392
Ala Ala Leu Gln Gln Lys Ser Gln Glu Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu
450                               455                               460

cag cag ctg gca gag cgc gag atc gac gtg ctg gag cgg gaa ctt aac 1440
Gln Gln Leu Ala Glu Arg Glu Ile Asp Val Leu Glu Arg Glu Leu Asn
465                               470                               475                               480

att ctg ata ttc cag cta aac cag gag aag ccc aag gta aag aag agg 1488
Ile Leu Ile Phe Gln Leu Asn Gln Glu Lys Pro Lys Val Lys Lys Arg
485                               490                               495

aag ggc aag ttt aag aga agt cgt tta aag ctc aaa gat gga cat cga 1536
Lys Gly Lys Phe Lys Arg Ser Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly His Arg
500                               505                               510

atc agt tta cct tca gat ttc cag cac aag ata acc gtg cag gcc tct 1584
Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Gln His Lys Ile Thr Val Gln Ala Ser

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

515	520	525	
ccc aac ttg gac aaa cgg cgg agc ctg aac agc agc agt tcc agt ccc Pro Asn Leu Asp Lys Arg Arg Ser Leu Asn Ser Ser Ser Ser Pro 530 535 540			1632
cgg agc agc ccc aca atg atg ccc cga ctc cga gcc ata cag ttg act Pro Ser Ser Pro Thr Met Met Pro Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Thr 545 550 555			1680
tca gat gaa agc aat aaa act tgg gga agg aac aca gtc ttt cga caa Ser Asp Glu Ser Asn Lys Thr Trp Gly Arg Asn Thr Val Phe Arg Gln 565 570 575			1728
gaa gaa ttt gag gat gta aaa agg aat ttt aag aaa ggt tgt acc Glu Glu Phe Glu Asp Val Lys Arg Asn Phe Lys Lys Lys Gly Cys Thr 580 585 590			1776
tgg gga cca aat tcc att caa atg aaa gat aga aca gat tgc aaa gaa Trp Gly Pro Asn Ser Ile Gln Met Lys Asp Arg Thr Asp Cys Lys Glu 595 600 605			1824
agg ata aga cct ctc tcc gat gcc aac agt cct tgg tca act atc tta Arg Ile Arg Pro Leu Ser Asp Gly Asn Ser Pro Trp Ser Thr Ile Leu 610 615 620			1872
ata aaa aat cag aaa acc atg ccc ttg gct tca ttg ttt gtg gac cag Ile Lys Asn Gln Lys Thr Met Pro Leu Ala Ser Leu Phe Val Asp Gln 625 630 635			1920
cca ggg tcc tgt gaa gag cca aaa ctt tcc cct gat gga tta gaa cac Pro Gly Ser Cys Glu Glu Pro Lys Leu Ser Pro Asp Gly Leu Glu His 645 650 655			1968
aga aaa cca aaa caa ata aaa ttg cct agt cag gcc tac att gat cta Arg Lys Pro Lys Gln Ile Lys Leu Pro Ser Gln Ala Tyr Ile Asp Leu 660 665 670			2016
cct ctt ggg aaa gat gct cag aga gag aat cct gca gaa gct gaa agc Pro Leu Gly Lys Asp Ala Gln Arg Glu Asn Pro Ala Glu Ala Glu Ser 675 680 685			2064
tgg gag gag gca gcc tct gcg aat gct gcc aca gtc tcc att gag atg Trp Glu Glu Ala Ala Ser Ala Asn Ala Ala Thr Val Ser Ile Glu Met 690 695 700			2112
act cct acg aat agt ctg agt aga tcc ccc cag aga aag aaa acg gag Thr Pro Thr Asn Ser Leu Ser Arg Ser Pro Gln Arg Lys Lys Thr Glu 705 710 715			2160
tca gct ctg tat ggg tgc acc atc ctt ctg gca tgg gtg gct ctg gga Ser Ala Leu Tyr Gly Cys Thr Ile Leu Leu Ala Ser Val Ala Leu Gly 725 730 735			2208
ctg gac ctc aga gat ctt cat aaa gca cag gct gct gaa gaa ccg ttg Leu Asp Leu Arg Asp Leu His Lys Ala Gln Ala Ala Glu Glu Pro Leu 740 745 750			2256
ccc aag gaa gag aag aag aaa cga gag gga atc ttc cag cgg gct tcc Pro Lys Glu Glu Lys Lys Lys Arg Glu Gly Ile Phe Arg Ala Ser 755 760 765			2304

WO 03/035840

PCT/US02/34037

aag tcc cgc aga agt gcc agt cct ccc aca agc ctg cca tcc acc ggt Lys Ser Arg Arg Ser Ala Ser Pro Pro Thr Ser Leu Pro Ser Thr Gly 770 775 780	2352
ggg gag gcc agc agc cca ccc tcc ctg cca ctg tca agt gcc ctg ggc Gly Glu Ala Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Ser Ser Ala Leu Gly 785 790 795 800	2400
atc ctc tcc aca cct tct ttc tcc aca aag tgc ctg ctg cag atg gac Ile Leu Ser Thr Pro Ser Phe Ser Thr Lys Cys Leu Leu Gln Met Asp 805 810 815	2448
agt gaa gat cca ctg gtg gac agt gca cct gtc act tgt gac tct gag Ser Glu Asp Pro Leu Val Asp Ser Ala Pro Val Thr Cys Asp Ser Glu 820 825 830	2496
atg ctc act ccg gat ttt tgt ccc act gcc cca gga agt ggt cgt gag Met Leu Thr Pro Asp Phe Cys Pro Thr Ala Pro Gly Ser Gly Arg Glu 835 840 845	2544
cca gcc ctc atg cca aga ctt gac act gat tgt agt gta tca aga aac Pro Ala Leu Met Pro Arg Leu Asp Thr Asp Cys Ser Val Ser Arg Asn 850 855 860	2592
tgg ccg tct tcc ttc cta cag cag aca tgt ggg aat gta cct tac tgt Leu Pro Ser Ser Phe Leu Gln Gln Thr Cys Gly Asn Val Pro Tyr Cys 865 870 875 880	2640
gct tct tca aaa cat aga ccg tca cat cac aga cgg acc atg tct gat Ala Ser Ser Lys His Arg Pro Ser His His Arg Arg Thr Met Ser Asp 885 890 895	2688
gga aat ccg acc cca act ggt gca act att atc tca gcc act gga gcc Gly Asn Pro Thr Pro Thr Gly Ala Thr Ile Ile Ser Ala Thr Gly Ala 900 905 910	2736
tct gca ctg cca ctc tgc ccc tca cct gct cct cac agt cat ctg cca Ser Ala Leu Pro Leu Cys Pro Ser Pro Ala Pro His Ser His Leu Pro 915 920 925	2784
agg gag gtc tca ccc aag aag cac agc act gtc cac atc gtg cct cag Arg Glu Val Ser Pro Lys Lys His Ser Thr Val His Ile Val Pro Gln 930 935 940	2832
cgt cgc cct gcc tcc ctg aga agc cgc tca gat ctg cct cag gct tac Arg Arg Pro Ala Ser Leu Arg Ser Arg Ser Asp Leu Pro Gln Ala Tyr 945 950 955 960	2880
cca cag aca gca gtg tct cag ctg gca cag act gcc tgt gta gtg ggt Pro Gln Thr Ala Val Ser Gln Leu Ala Gln Thr Ala Cys Val Val Gly 965 970 975	2928
cgc cca gga cca cat ccc acc caa ttc ctc gct gcc aag gag aga act Arg Pro Gly Pro His Pro Thr Gln Phe Leu Ala Ala Lys Glu Arg Thr 980 985 990	2976
aaa tcc cat gtg cct tca tta ctg gat gct gac gtg gaa ggt cag agc Lys Ser His Val Pro Ser Leu Leu Asp Ala Asp Val Glu Gly Gln Ser 995 1000 1005	3024

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

agg gac tac act gtg cca ctg tgc aga atg agg agc aaa acc agc cgg 3072
Arg Asp Tyr Thr Val Pro Leu Cys Arg Met Arg Ser Lys Thr Ser Arg
1010 1015 1020

cca tct ata tat gaa ctg gag aaa gaa ttc ctg tct taa 3111
Pro Ser Ile Tyr Glu Leu Glu Lys Glu Phe Leu Ser *
1025 1030 1035

<210> 4
<211> 7825
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (67)...(6648)

<400> 4
cacgcgttaag cttggggccc tcgagggatc ctctagagcgc gccgccgaga cgtccccggc 60
acgctg atg gag ccc ggg cgc ggc gcg ggg ccc gcg ggc atg gcg gag 108
Met Glu Pro Gly Arg Gly Ala Gly Pro Ala Gly Met Ala Glu
1 5 10

cct cgg gcg aag gcg ggc cgg ccg ggg ccc cag cgc ttt ctg cgg cgc 156
Pro Arg Ala Lys Ala Ala Arg Pro Gly Pro Gln Arg Phe Leu Arg Arg
15 20 25 30

agc gtg gta gag tcg gac cag gag gag ccg ccg ggc ttg gag gca gcc 204
Ser Val Val Glu Ser Asp Gln Glu Glu Pro Pro Gly Leu Glu Ala Ala
35 40 45

gag gcg ccg ggc ccg cag ccc ccg cag ccc ctg cag cgc cgg gtg ctt 252
Glu Ala Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Leu Gln Arg Arg Val Leu
50 55 60

ctg ctc tgc aag acg cgc cgc ctc atc gcg gag cgc gcc cgc gga cgc 300
Leu Leu Cys Lys Thr Arg Arg Leu Ile Ala Glu Arg Ala Arg Gly Arg
65 70 75

ccc gcc gcc ccc gcg ccc gca gcg ctg gta gcg cag ccg gga gcc ccc 348
Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ala Leu Val Ala Gln Pro Gly Ala Pro
80 85 90

gga gcc ccc gcg gac gcc ggc ccc gag ccc gtg ggc acg cag gag ccc 396
Gly Ala Pro Ala Asp Ala Gly Pro Glu Pro Val Gly Thr Gln Glu Pro
95 100 105 110

ggc ccg gac ccc atc gca gcc gct gtc gaa acc gcg cct gcc ccc gac 444
Gly Pro Asp Pro Ile Ala Ala Ala Val Glu Thr Ala Pro Ala Pro Asp
115 120 125

ggc ggc ccc agg gag gag gcg gcg gct acc gtg agg aag gag gat gag 492
Gly Gly Pro Arg Glu Glu Ala Ala Ala Thr Val Arg Lys Glu Asp Glu
130 135 140

ggg gcg gcc gag gcg aag cct gag ccc ggg cgc act cgc cgg gac gag 540
Gly Ala Ala Glu Ala Lys Pro Glu Pro Gly Arg Thr Arg Arg Asp Glu
145 150 155

ccc gaa gag gag gag gac gac gag gac gac ctc aag gcc gtg gcc acc 588

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Pro Glu Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Leu Lys Ala Val Ala Thr
160                               165                               170

tct ctg gac ggc cgc ttc ctc aag ttc gac atc gag ctg ggc cgc ggt 636
Ser Leu Asp Gly Arg Phe Leu Lys Phe Asp Ile Glu Leu Gly Arg Gly
175                               180                               185                               190

tcc ttc aag acg gtc tac aag ggg ctg gac acg gag acc tgg gtg gag 684
Ser Phe Lys Thr Val Tyr Lys Gly Leu Asp Thr Glu Thr Trp Val Glu
195                               200                               205

gtg gcc tgg tgt gag ctg cag gac cgg aag ctc acc aag ctg gag cgg 732
Val Ala Trp Cys Glu Leu Gln Asp Arg Lys Leu Thr Lys Leu Glu Arg
210                               215                               220

cag cgg ttc aag gaa gag gct gag atg ctg aaa ggc ctg cag cac ccc 780
Gln Arg Phe Lys Glu Glu Ala Glu Met Leu Lys Gly Leu Gln His Pro
225                               230                               235

aac atc gtg cgc ttc tac gac ttc tgg gag tcc agc gcc aag ggc aag 828
Asn Ile Val Arg Phe Tyr Asp Phe Trp Glu Ser Ser Ala Lys Gly Lys
240                               245                               250

cgg tgc att gtg ctg gtg acg gag ctg atg acc tca ggg acg ctg aag 876
Arg Cys Ile Val Leu Val Thr Glu Leu Met Thr Ser Gly Thr Leu Lys
255                               260                               265

aca tac ctg aag cgg ttc aag gtg atg aag ccc aag gtt ctc cgc agc 924
Thr Tyr Leu Lys Arg Phe Lys Val Met Lys Pro Lys Val Leu Arg Ser
275                               280                               285

tgg tgc cgg cag atc ctg aag ggc ctg ctg ttc ctg cac aca agg acg 972
Trp Cys Arg Gln Ile Leu Lys Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Arg Thr
290                               295                               300

cca ccc atc atc cac cga gac ctg aaa tgt gac aat att ttc atc acc 1020
Pro Pro Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Cys Asp Asn Ile Phe Ile Thr
305                               310                               315

gga cca act ggg tct gtg aag att ggc gac ttg ggc ctg gcc act ctg 1068
Gly Pro Thr Gly Ser Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Thr Leu
320                               325                               330

aaa aga gcg tca ttt gcc aaa agt gtg ata ggt act ccc gag ttc atg 1116
Lys Arg Ala Ser Phe Ala Lys Ser Val Ile Gly Thr Pro Glu Phe Met
335                               340                               345                               350

gcg ccc gag atg tac gag gag cac tac gat gag tcc gtg gac gtc tat 1164
Ala Pro Glu Met Tyr Glu Glu His Tyr Asp Glu Ser Val Asp Val Tyr
355                               360                               365

gcc ttt ggg atg tgc atg ctg gag atg gcc acc tcg gag tac ccc tac 1212
Ala Phe Gly Met Cys Met Leu Glu Met Ala Thr Ser Glu Tyr Pro Tyr
370                               375                               380

tcg gag tgc cag aat gcg gcc cag atc tac cgc aag gtc acc tgt ggt 1260
Ser Glu Cys Gln Asn Ala Ala Gln Ile Tyr Arg Lys Val Thr Cys Gly
385                               390                               395

atc aag ccg gcc agc ttt gag aaa gtg cac gat cct gaa atc aag gag 1308
Ile Lys Pro Ala Ser Phe Glu Lys Val His Asp Pro Glu Ile Lys Glu

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

400	405	410	
att att ggg gag tgt atc tgc aaa aac aag gag gaa agg tac gag atc Ile Ile Gly Glu Cys Ile Cys Lys Asn Lys Glu Glu Arg Tyr Glu Ile 415 420 425 430			1356
aaa gac ctg ctg agc cac gcc ttc ttc gca gag gac aca ggc gtg agg Lys Asp Leu Leu Ser His Ala Phe Phe Ala Glu Asp Thr Gly Val Arg 435 440 445			1404
gtg gag ctg gcg gag gag gac cac ggc agg aag tcc acc atc gcc ctg Val Glu Leu Ala Glu Glu Asp His Gly Arg Lys Ser Thr Ile Ala Leu 450 455 460			1452
agg ctg tgg gtg gaa gac ccc aag aaa ctg aag gga aag ccc aag gac Arg Leu Trp Val Glu Asp Pro Lys Lys Leu Lys Gly Lys Pro Lys Asp 465 470 475			1500
aat gga gcc ata gag ttc acc ttc gac ctg gag aag gag acg ccg gat Asn Gly Ala Ile Glu Phe Thr Phe Asp Leu Glu Lys Glu Thr Pro Asp 480 485 490			1548
gag gtg gcc caa gag atg att gag tct gga ttc ttc cac gag agt gac Glu Val Ala Gln Glu Met Ile Glu Ser Gly Phe Phe His Glu Ser Asp 495 500 505 510			1596
gtc aag atc gtg gcc aag tcc atc cgt gac cgc gtg gcc ttg atc cag Val Lys Ile Val Ala Lys Ser Ile Arg Asp Arg Val Ala Leu Ile Gln 515 520 525			1644
tgg cgg cgg gag agg atc tgg ccc gcg ctg cag ccc aag gag cag cag Trp Arg Arg Glu Arg Ile Trp Pro Ala Leu Gln Pro Lys Glu Gln Gln 530 535 540			1692
gat gtg ggc agc ccg gac aag gcc agg ggt ccg ccg gtg ccc ctg cag Asp Val Gly Ser Pro Asp Lys Ala Arg Gly Pro Pro Val Pro Leu Gln 545 550 555			1740
gtc cag gtg acc tac cat gca cag gct ggg cag ccc ggg cca cca gag Val Gln Val Thr Tyr His Ala Gln Ala Gly Gln Pro Gly Pro Pro Glu 560 565 570			1788
ccc gag gag ccg gag gcc gac cag cac ctg ctg cca cct acg ttg ccg Pro Glu Glu Pro Glu Ala Asp Gln His Leu Leu Pro Pro Thr Leu Pro 575 580 585 590			1836
acc agc gcc acc tcc ctg gcc tcg gac agc acc ttc gac agc ggc cag Thr Ser Ala Thr Ser Leu Ala Ser Asp Ser Thr Phe Asp Ser Gly Gln 595 600 605			1884
ggc tct acc gtg tac tca gac tcg cag agc agc cag cag agc gtg atg Gly Ser Thr Val Tyr Ser Asp Ser Gln Ser Ser Gln Gln Ser Val Met 610 615 620			1932
ctt ggc tcc ctt gcc gac gca gcg ccg tcc ccg gcc cag tgt gtg tgc Leu Gly Ser Leu Ala Asp Ala Ala Pro Ser Pro Ala Gln Cys Val Cys 625 630 635			1980
agc ccc cct gtg agc gag ggg ccc gtc ctg ccg cag agc ctg ccc tcg Ser Pro Pro Val Ser Glu Gly Pro Val Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ser 640 645 650			2028

WO 03/035840

PCT/US02/34037

ctg ggg gcc tac cag cag ccc acg gct gca cct cct ccg ctg gcc cag Leu Gly Ala Tyr Gln Gln Pro Thr Ala Ala Pro Pro Pro Leu Ala Gln 655 660 665 670	2076
ccg aca ccc ctg ccg cag gtc ctg gcc cca cag ccc gtg gtc ccc ctc Pro Thr Pro Leu Pro Gln Val Leu Ala Pro Gln Pro Val Val Pro Leu 675 680 685	2124
cag ccg gtt ccc ccc cac ctg cca ccg tac ctg gct cca gcc tcc cag Gln Pro Val Pro Pro His Leu Pro Pro Tyr Leu Ala Pro Ala Ser Gln 690 695 700	2172
gtg ggg gcc ccc gct cag ctg aag ccc ctc cag atg cca cag gcg ccc Val Gly Ala Pro Ala Gln Leu Lys Pro Leu Gln Met Pro Gln Ala Pro 705 710 715	2220
ctg cag ccg ctt gct caa gtc cct ccg cag atg ccc ccg att cct gtt Leu Gln Pro Leu Ala Gln Val Pro Pro Gln Met Pro Pro Ile Pro Val 720 725 730	2268
gtg ccc ccc atc acg ccc ctg gcg gga atc gac gcc ctc cct ccg gcc Val Pro Pro Ile Thr Pro Leu Ala Gly Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ala 735 740 745 750	2316
ctc cca gac ctg ccg acc gcg act gtg cct ccc gtg cca cca cct cag Leu Pro Asp Leu Pro Thr Ala Thr Val Pro Pro Val Pro Pro Pro Gln 755 760 765	2364
tat ttc tct cca gcc gtg atc ttg ccg agc ctc gct gcc cca ctc ccc Tyr Phe Ser Pro Ala Val Ile Leu Pro Ser Leu Ala Ala Pro Leu Pro 770 775 780	2412
cct gcg tcc cca gcc ttg cct ctg cag gct gtg aag ctg ccc cac ccc Pro Ala Ser Pro Ala Leu Pro Leu Gln Ala Val Lys Leu Pro His Pro 785 790 795	2460
cct ggg gcg ccc ctg gcc atg ccc tgc cgg acc att gtg cca aat gca Pro Gly Ala Pro Leu Ala Met Pro Cys Arg Thr Ile Val Pro Asn Ala 800 805 810	2508
ccg gcc act atc ccc ctg ctg gcc gta gcc cca ccg gcc gtg gct gcc Pro Ala Thr Ile Pro Leu Leu Ala Val Ala Pro Pro Gly Val Ala Ala 815 820 825 830	2556
ctg tcc att cat tct gcc gtg gcc cag ctc cca gcc caa cct gtg tac Leu Ser Ile His Ser Ala Val Ala Gln Leu Pro Gly Gln Pro Val Tyr 835 840 845	2604
cca gcg gcc ttc cca cag atg gcg cct act gac gtc cct cct tcc ccc Pro Ala Ala Phe Pro Gln Met Ala Pro Thr Asp Val Pro Pro Ser Pro 850 855 860	2652
cat cac acg gtg cag aat atg agg gcc acc cct cca cag ccg gca ctg His His Thr Val Gln Asn Met Arg Ala Thr Pro Pro Gln Pro Ala Leu 865 870 875	2700
cct cca caa ccc aca ctg ccc cca caa ccc gtg ctg ccc ccg caa ccc Pro Pro Gln Pro Thr Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro 880 885 890	2748

WO 03/035840

PCT/US02/34037

acg ctg ccc cct caa cct gtg ttg ccc ccg caa ccc aca cgg ccc cct	2796
Thr Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Thr Arg Pro Pro	
895 900 905 910	
caa cct gtg ctg ccc ccg caa ccc atg ctg ccc cca caa cct gtg ctg	2844
Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Met Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu	
915 920 925	
ccc ccg cag ccg gca ctg cct gtg cgc cct gag ccc ctc cag ccc cac	2892
Pro Pro Gln Pro Ala Leu Pro Val Arg Pro Glu Pro Leu Gln Pro His	
930 935 940	
ctt cct gaa caa gct gct cca gct gct aca cca ggg agc cag att ctg	2940
Leu Pro Glu Gln Ala Ala Pro Ala Ala Thr Pro Gly Ser Gln Ile Leu	
945 950 955	
ctt ggc cac cca gct ccc tat gct gtg gac gtc gcc gct cag gtc ccc	2988
Leu Gly His Pro Ala Pro Tyr Ala Val Asp Val Ala Ala Gln Val Pro	
960 965 970	
acc gtg cct gtg cca ccg gct gcg gtc ctc tcc ccg cct ctg ccg gaa	3036
Thr Val Pro Val Pro Pro Ala Ala Val Leu Ser Pro Pro Leu Pro Glu	
975 980 985 990	
gtg ctg ctg cct gcc gcc cct gag ctc ctg cct cag ttc ccc agc tcc	3084
Val Leu Leu Pro Ala Ala Pro Glu Leu Leu Pro Gln Phe Pro Ser Ser	
995 1000 1005	
ctg gcc acg gtg tct gcc tct gtg cag agt gtg ccc acc cag act gcc	3132
Leu Ala Thr Val Ser Ala Ser Val Gln Ser Val Pro Thr Gln Thr Ala	
1010 1015 1020	
aca ctt ctg cca cca gca aac cca ccg ctg cct ggc ggg ccc ggg atc	3180
Thr Leu Leu Pro Pro Ala Asn Pro Pro Leu Pro Gly Gly Pro Gly Ile	
1025 1030 1035	
gcc agc cct tgc cca act gtc cag ctg acg gtg gaa cca gtc caa gag	3228
Ala Ser Pro Cys Pro Thr Val Gln Leu Thr Val Glu Pro Val Gln Glu	
1040 1045 1050	
gag cag gcc tca cag gac aag ccg ccc ggc ctc ccg cag agc tgt gag	3276
Glu Gln Ala Ser Gln Asp Lys Pro Pro Gly Leu Pro Gln Ser Cys Glu	
1055 1060 1065 1070	
agc tat gga ggt tct gat gtc act tct gga aaa gag ctg agt gac agc	3324
Ser Tyr Gly Gly Ser Asp Val Thr Ser Gly Lys Glu Leu Ser Asp Ser	
1075 1080 1085	
tgt gaa gcc gcc ttt gga ggg gcc agg ctg gag gcc agg gca gcc cga	3372
Cys Glu Gly Ala Phe Gly Gly Gly Arg Leu Glu Gly Arg Ala Ala Arg	
1090 1095 1100	
aaa cac cac cgc agg tcc acg cgt gcg cgc tcc ccg cag gag agg gcc	3420
Lys His His Arg Arg Ser Thr Arg Ala Arg Ser Arg Gln Glu Arg Ala	
1105 1110 1115	
agc ccg ccc ccg ctt acc atc ttg aac gtg tgc aac act ccg gac aag	3468
Ser Arg Pro Arg Leu Thr Ile Leu Asn Val Cys Asn Thr Gly Asp Lys	
1120 1125 1130	
atg gtg gag tgc cag ctg gag acg cac aac cac aag atg gtg acc ttc	3516

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Met Val Glu Cys Gln Leu Glu Thr His Asn His Lys Met Val Thr Phe
1135                1140                1145                1150

aag ttc gac ttg gac ggg gac gca ccc gat gaa att gcc acg tat atg   3564
Lys Phe Asp Leu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Glu Ile Ala Thr Tyr Met
                1155                1160                1165

gtg gag cat gac ttt atc ctg cag gcc gag cgg gaa acg ttc atc gag   3612
Val Glu His Asp Phe Ile Leu Gln Ala Glu Arg Glu Thr Phe Ile Glu
                1170                1175                1180

cag atg aag gat gtc atg gac aag gca gag gac atg ctc agc gag gac   3660
Gln Met Lys Asp Val Met Asp Lys Ala Glu Asp Met Leu Ser Glu Asp
                1185                1190                1195

aca gac gcc gac cgt ggc tcc gac cca ggg acc agc ccg cca cac ctc   3708
Thr Asp Ala Asp Arg Gly Ser Asp Pro Gly Thr Ser Pro Pro His Leu
                1200                1205                1210

agc acc tgc ggc ctg ggc acc ggg gag gag agc cga caa tcc caa gcc   3756
Ser Thr Cys Gly Leu Gly Thr Gly Glu Glu Ser Arg Gln Ser Gln Ala
1215                1220                1225                1230

aac gcc ccc gtg tat cag cag aac gtc ctg cac acc ggg aag agg tgg   3804
Asn Ala Pro Val Tyr Gln Gln Asn Val Leu His Thr Gly Lys Arg Trp
                1235                1240                1245

ttc atc atc tgt ccg gtg gct gag cac ccc gcc ccc gag gcc cct gaa   3852
Phe Ile Ile Cys Pro Val Ala Glu His Pro Ala Pro Glu Ala Pro Glu
                1250                1255                1260

tct tcg ccc cca ctt cct cta agc tcc ctg ccg cca gaa gcc agc caa   3900
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Pro Pro Glu Ala Ser Gln
                1265                1270                1275

gat tca gcg ccc tat aaa gac cag ctg tcc tcg aag gaa caa ccc agc   3948
Asp Ser Ala Pro Tyr Lys Asp Gln Leu Ser Ser Lys Glu Gln Pro Ser
1280                1285                1290

ttt cta gcc agt cag cag ctc ctg agc cag gcg ggc ccc agc aac cct   3996
Phe Leu Ala Ser Gln Gln Leu Leu Ser Gln Ala Gly Pro Ser Asn Pro
1295                1300                1305                1310

cct ggg gca ccc cca gcc cct ttg gcc ccc tcc tcc cct cct gtg act   4044
Pro Gly Ala Pro Pro Ala Pro Leu Ala Pro Ser Ser Pro Pro Val Thr
                1315                1320                1325

gct ctg ccc caa gat gga gca gct cca gcc acc agc acc atg cca gag   4092
Ala Leu Pro Gln Asp Gly Ala Ala Pro Ala Thr Ser Thr Met Pro Glu
                1330                1335                1340

cca gcg tca gga act gcc agc cag gca ggg ggt cca ggg aca cct cag   4140
Pro Ala Ser Gly Thr Ala Ser Gln Ala Gly Gly Pro Gly Thr Pro Gln
1345                1350                1355

ggg ctg acc agt gag ctc gag acg tct cag cca cta gcg gag act cac   4188
Gly Leu Thr Ser Glu Leu Glu Thr Ser Gln Pro Leu Ala Glu Thr His
1360                1365                1370

gag gcc ccg ctt gct gtg cag ccc ctc gtg gtg ggc cta gca cct tgc   4236
Glu Ala Pro Leu Ala Val Gln Pro Leu Val Val Gly Leu Ala Pro Cys

```

WO 03/035840										PCT/US02/34037									
1375					1380					1385					1390				
act cca gct cca gag gct gcc tca acc agg gac gcc agt gcc cca agg																			4284
Thr Pro Ala Pro Glu Ala Ala Ser Thr Arg Asp Ala Ser Ala Pro Arg																			
	1395					1400					1405								
gag ccc ctg cca cct cct gca cct gag ccc agc ccc cac agc ggg acc																			4332
Glu Pro Leu Pro Pro Pro Ala Pro Glu Pro Ser Pro His Ser Gly Thr																			
	1410					1415					1420								
cca cag ccc gcc ttg ggt cag cct gct ccc ctg ctt cct gcc gca gtg																			4380
Pro Gln Pro Ala Leu Gly Gln Pro Ala Pro Leu Leu Pro Ala Ala Val																			
	1425					1430					1435								
ggg gcc gtc agc ctg gcc acc tcc cag ctc cca agc cca ccc ctg ggg																			4428
Gly Ala Val Ser Leu Ala Thr Ser Gln Leu Pro Ser Pro Pro Leu Gly																			
	1440					1445					1450								
ccc acc gtc ccc cca cag cca ccc tcg gcc ctg gag tcg gat ggg gaa																			4476
Pro Thr Val Pro Pro Gln Pro Pro Ser Ala Leu Glu Ser Asp Gly Glu																			
	1455					1460					1465				1470				
ggg ccg ccc ccc agg ctg gcc ttt gtg gac agc acc atc aag agc ctg																			4524
Gly Pro Pro Pro Arg Val Gly Phe Val Asp Ser Thr Ile Lys Ser Leu																			
	1475					1480					1485								
gac gag aag ctg cgg act ctg ctc tac cag gag cac gtg ccc acc tcc																			4572
Asp Glu Lys Leu Arg Thr Leu Leu Tyr Gln Glu His Val Pro Thr Ser																			
	1490					1495					1500								
tca gcc tca gct ggg acc cct gtg gag gtg gcc gac aga gac ttc acc																			4620
Ser Ala Ser Ala Gly Thr Pro Val Glu Val Gly Asp Arg Asp Phe Thr																			
	1505					1510					1515								
ctg gag ccc ctg aga ggg gac cag ccc cgc tca gag gtc tgc ggg ggg																			4668
Leu Glu Pro Leu Arg Gly Asp Gln Pro Arg Ser Glu Val Cys Gly Gly																			
	1520					1525					1530								
gac ctg gcc ctg ccc cca gtg cct aag gag gcg gtc tca ggg cgt gtc																			4716
Asp Leu Ala Leu Pro Pro Val Pro Lys Glu Ala Val Ser Gly Arg Val																			
	1535					1540					1545				1550				
cag ctg ccc cag ccc ttg gtg gag aag tca gaa ctg gcc ccc act cga																			4764
Gln Leu Pro Gln Pro Leu Val Glu Lys Ser Glu Leu Ala Pro Thr Arg																			
	1555					1560					1565								
ggg gcc gtg atg gag cag gcc acg tcc tcg tca atg aca gag tcg tct																			4812
Gly Ala Val Met Glu Gln Gly Thr Ser Ser Ser Met Thr Glu Ser Ser																			
	1570					1575					1580								
ccc agg agt atg cta gcc tat gac aga gat gga agg cag gtg gcc tca																			4860
Pro Arg Ser Met Leu Gly Tyr Asp Arg Asp Gly Arg Gln Val Ala Ser																			
	1585					1590					1595								
gac tcc cat gtg gtc ccc agc gtc ccc cag gat gta cct gct ttt gtg																			4908
Asp Ser His Val Val Pro Ser Val Pro Gln Asp Val Pro Ala Phe Val																			
	1600					1605					1610								
aga cct gca cgt gtg gag ccc aca gac agg gat ggt gga gaa gct gga																			4956
Arg Pro Ala Arg Val Glu Pro Thr Asp Arg Asp Gly Gly Glu Ala Gly																			
	1615					1620					1625				1630				

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

gaa agc tcg gca gag ccc ccg ccg agt gac atg ggc aca gtg ggg ggc 5004
Glu Ser Ser Ala Glu Pro Pro Pro Ser Asp Met Gly Thr Val Gly Gly
1635 1640 1645

cag gct agc cac ccc cag aca ctc ggc gct cga gct ttg ggg tcc cct 5052
Gln Ala Ser His Pro Gln Thr Leu Gly Ala Arg Ala Leu Gly Ser Pro
1650 1655 1660

cgg aaa cgt cca gag cag cag gat gtc agc tca cca gcc aag act gtg 5100
Arg Lys Arg Pro Glu Gln Gln Asp Val Ser Ser Pro Ala Lys Thr Val
1665 1670 1675

ggc cgt ttc tcg gtg gtc agc act cag gac gag tgg acc ctg gcc tcc 5148
Gly Arg Phe Ser Val Val Ser Thr Gln Asp Glu Trp Thr Leu Ala Ser
1680 1685 1690

ccc cac agc ctg aga tac tct gcc cca ccc gac gtc tac ctg gac gag 5196
Pro His Ser Leu Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Asp Val Tyr Leu Asp Glu
1695 1700 1705 1710

gcc ccc tcc agc ccc gac gtg aag ctg gca gtg cgg cgg gcg cag acg 5244
Ala Pro Ser Ser Pro Asp Val Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Gln Thr
1715 1720 1725

gcc tcc tcc atc gag gtc gcc gtg ggc gag ccc gtg tcc agc gac tct 5292
Ala Ser Ser Ile Glu Val Gly Val Gly Glu Pro Val Ser Ser Asp Ser
1730 1735 1740

ggg gac gag ggc cct ccg gcg aga ccc ccg gtg cag aag cag gcg tcc 5340
Gly Asp Glu Gly Pro Arg Ala Arg Pro Pro Val Gln Lys Gln Ala Ser
1745 1750 1755

ctg ccc gtg agt ggc agc gtg gct ggc gac ttc gtg aag aag gcc acc 5388
Leu Pro Val Ser Gly Ser Val Ala Gly Asp Phe Val Lys Lys Ala Thr
1760 1765 1770

gcc ttc ctg cag agg cct tct ccg gcc ggc tcg ctg ggc ccc gag aca 5436
Ala Phe Leu Gln Arg Pro Ser Arg Ala Gly Ser Leu Gly Pro Glu Thr
1775 1780 1785 1790

ccc agc agg gtg ggc atg aag gtc ccc acg atc agc gtg acc tcc ttc 5484
Pro Ser Arg Val Gly Met Lys Val Pro Thr Ile Ser Val Thr Ser Phe
1795 1800 1805

cat tcc cag tcg tcc tac atc agc agc gac aat gat tcg gag ctg gag 5532
His Ser Gln Ser Ser Tyr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Ser Glu Leu Glu
1810 1815 1820

gat gct gac ata aag aag gag ctg cag agt ctg cgg gag aag cac ctg 5580
Asp Ala Asp Ile Lys Lys Glu Leu Gln Ser Leu Arg Glu Lys His Leu
1825 1830 1835

aag gag atc tcg gag ctg cag agc cag cag aag cag gag atc gaa gct 5628
Lys Glu Ile Ser Glu Leu Gln Ser Gln Gln Lys Gln Glu Ile Glu Ala
1840 1845 1850

ctg tac cgc cgc ctg ggc aag cca ctg ccc ccc aac gtg ggc ttc ttc 5676
Leu Tyr Arg Arg Leu Gly Lys Pro Leu Pro Pro Asn Val Gly Phe Phe
1855 1860 1865 1870

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

cac acg gca ccc ccc act ggc cgc cgg aga aaa acc agc aag agc aag 5724
His Thr Ala Pro Pro Thr Gly Arg Arg Arg Lys Thr Ser Lys Ser Lys
1875 1880 1885

ctg aag gca ggc aag ctg cta aat ccc ctg gtg cgg cag ctc aag gtc 5772
Leu Lys Ala Gly Lys Leu Leu Asn Pro Leu Val Arg Gln Leu Lys Val
1890 1895 1900

gtg gcc tcc agc aca ggt cac ttg gct gac tcc agc aga ggc cct ccc 5820
Val Ala Ser Ser Thr Gly His Leu Ala Asp Ser Ser Arg Gly Pro Pro
1905 1910 1915

gct aag gac cct gcc caa gcc agt gtg ggg ctc act gca gac agc acg 5868
Ala Lys Asp Pro Ala Gln Ala Ser Val Gly Leu Thr Ala Asp Ser Thr
1920 1925 1930

ggc ctg agc ggg aag gca gtg cag acc cag cag ccc tgc tcc gtc cgg 5916
Gly Leu Ser Gly Lys Ala Val Gln Thr Gln Gln Pro Cys Ser Val Arg
1935 1940 1945 1950

gcc tcc ctg tct tgg gac atc tgc tcc ggc tta gcc agt gat gga ggc 5964
Ala Ser Leu Ser Ser Asp Ile Cys Ser Gly Leu Ala Ser Asp Gly Gly
1955 1960 1965

gga gcg cgt gcc caa gcc tgg acg gtt tac cac cca acg tct gag aga 6012
Gly Ala Arg Gly Gln Gly Trp Thr Val Tyr His Pro Thr Ser Glu Arg
1970 1975 1980

gtg acc tat aag tct agt agc aaa cct cgt gct cga ttc ctc agt gga 6060
Val Thr Tyr Lys Ser Ser Ser Lys Pro Arg Ala Arg Phe Leu Ser Gly
1985 1990 1995

ccc gta tct gtg tcc atc tgg tct gcc ctg aag cgt ctc tgc cta gcc 6108
Pro Val Ser Val Ser Ile Trp Ser Ala Leu Lys Arg Leu Cys Leu Gly
2000 2005 2010

aaa gaa cac agc agt agg tcc tcc acc agc agc ctg gcc cca ggc cct 6156
Lys Glu His Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ser Ser Leu Ala Pro Gly Pro
2015 2020 2025 2030

gag cca ggc ccc cag ccc gcc ctg cac gtc cag gcg cag gtg aac aac 6204
Glu Pro Gly Pro Gln Pro Ala Leu His Val Gln Ala Gln Val Asn Asn
2035 2040 2045

agc aac aac aag aag ggt acc ttc acg gac gac ctg cac aag ctg gtg 6252
Ser Asn Asn Lys Lys Gly Thr Phe Thr Asp Asp Leu His Lys Leu Val
2050 2055 2060

gac gag tgg acg agc aag acg gtg ggg gcc gcg cag ctg aag ccc acg 6300
Asp Glu Trp Thr Ser Lys Thr Val Gly Ala Ala Gln Leu Lys Pro Thr
2065 2070 2075

ctc aac cag ctg aag cag acc cag aag ctg caa gac atg gag gcc cag 6348
Leu Asn Gln Leu Lys Gln Thr Gln Lys Leu Gln Asp Met Glu Ala Gln
2080 2085 2090

gca ggc tgg gct gcc cct gcc gag gcg cgg gct atg acc gca cct cga 6396
Ala Gly Trp Ala Ala Pro Gly Glu Ala Arg Ala Met Thr Ala Pro Arg
2095 2100 2105 2110

gca gga gtg ggg atg cca cgt ctg ccc cca gcg ccc ggc cct ctg tcc 6444

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Ala Gly Val Gly Met Pro Arg Leu Pro Pro Ala Pro Gly Pro Leu Ser
      2115                      2120                      2125
acc acg gtc att ccc gga gcc gcc ccg acc ctg tcc gtg ccc aca cca 6492
Thr Thr Val Ile Pro Gly Ala Ala Pro Thr Leu Ser Val Pro Thr Pro
      2130                      2135                      2140
gat gcc gcc ctc gga acc gcc cgg aga aac cag gtg tgg ttt ggc ctc 6540
Asp Gly Ala Leu Gly Thr Ala Arg Arg Asn Gln Val Trp Phe Gly Leu
      2145                      2150                      2155
cga gtc ccc ccc acc gcc tgc tgt ggg cac agc act cag ccg cga ggg 6588
Arg Val Pro Pro Thr Ala Cys Cys Gly His Ser Thr Gln Pro Arg Gly
      2160                      2165                      2170
gga cag cgg gtg ggc agc aag act gct tcc ttt gog gct tca gac cct 6636
Gly Gln Arg Val Gly Ser Lys Thr Ala Ser Phe Ala Ala Ser Asp Pro
      2175                      2180                      2185                      2190
gtt cgc tcc tag gtccctgtgg tccacgcgcc gtctccacac ccacttccta 6688
Val Arg Ser *

```

```

tacttgagtt gatgggttaga accttgctgt caccctgcag aagtacagtg ccttgaatgc 6748
cagcttttcc gttccctgat gaaaagatat gttaaaaaaa attatcggaa aaggtttcat 6808
ttgcaattgg cttgtgcatt gataatcttt atttactggt ttaagtgtca gagatgtgaa 6868
tgggttacaa atctggaagt gaagttcaat ctttggtttt ctgttgtaaa tgccttttac 6928
aaacattgaa ttagctacct taagtattga agagcttcca ttgctaggtg agccctgttt 6988
tgtcttcagt agagtgcggg ttccctgggc tcatccaggg gctgagagay ggcgggackx 7048
kgggggcagg cacactggcg gagctgcttg ctacgtaggg aatgtcagtt gttgcgctgg 7108
gcoatgagaa atccgcoaga aaacgttagg tgagcagaca tgcccccact gccagtgggc 7168
tgtgtgaggt gaggataaag tgtgtgttgg gcatagaaac cctggctgcc cgcaccacct 7228
gtggagacaa gtgcagctcc tcoagcttga gaggtgccc tctctcctgc ccacttccct 7288
ccctctccca tgatttccat ggagacctgt ggcctgtctc acccttgcca tgcagaccgc 7348
tctccctccc agccctaagc ctgctctgcy gagggcgggg tcatcttctt cctggagatt 7408
tcagtgggac tcttccccag tgggcacaa acagcccttg gtggggaggg aagggccag 7468
cctctctcac ctcccactgg aaagcagact gcttgggact gccagctgt gaattgtata 7528
gtttctgtac ttattagaac tgggttaatt attttgttcc aaatctatta ttccatcaat 7588
tcagttagaa ttgaattttc taggtgatta tgcagaatct tctgccaggg cagcatgctg 7648
tcgtaagaga tttctgttct ctgtactggg ccccttgccc ctgttccctg agtgaagtgg 7708
gggctgccct cacctgtccc ccttgccctg gaatcccttc cttgtacatg gtggtcagtg 7768
gcacggaatc cccaatagat tgtatatctg aaggagaaaa ataacactt ttgctcg 7825

```

```

<210> 5
<211> 2193
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

```

```

<400> 5
Met Glu Pro Gly Arg Gly Ala Gly Pro Ala Gly Met Ala Glu Pro Arg
 1      5      10      15
Ala Lys Ala Ala Arg Pro Gly Pro Gln Arg Phe Leu Arg Arg Ser Val
20      25      30
Val Glu Ser Asp Gln Glu Glu Pro Pro Gly Leu Glu Ala Ala Glu Ala
35      40      45
Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Leu Gln Arg Arg Val Leu Leu Leu
50      55      60
Cys Lys Thr Arg Arg Leu Ile Ala Glu Arg Ala Arg Gly Arg Pro Ala
65      70      75      80
Ala Pro Ala Pro Ala Ala Leu Val Ala Gln Pro Gly Ala Pro Gly Ala
85      90      95

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Pro Ala Asp Ala Gly Pro Glu Pro Val Gly Thr Gln Glu Pro Gly Pro
 100 105 110
 Asp Pro Ile Ala Ala Ala Val Glu Thr Ala Pro Ala Pro Asp Gly Gly
 115 120 125
 Pro Arg Glu Glu Ala Ala Ala Thr Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Ala
 130 135 140
 Ala Glu Ala Lys Pro Glu Pro Gly Arg Thr Arg Asp Glu Pro Glu
 145 150 155 160
 Glu Glu Glu Asp Asp Glu Asp Asp Leu Lys Ala Val Ala Thr Ser Leu
 165 170 175
 Asp Gly Arg Phe Leu Lys Phe Asp Ile Glu Leu Gly Arg Gly Ser Phe
 180 185 190
 Lys Thr Val Tyr Lys Gly Leu Asp Thr Glu Thr Trp Val Glu Val Ala
 195 200 205
 Trp Cys Glu Leu Gln Asp Arg Lys Leu Thr Lys Leu Glu Arg Gln Arg
 210 215 220
 Phe Lys Glu Glu Ala Glu Met Leu Lys Gly Leu Gln His Pro Asn Ile
 225 230 235 240
 Val Arg Phe Tyr Asp Phe Trp Glu Ser Ser Ala Lys Gly Lys Arg Cys
 245 250 255
 Ile Val Leu Val Thr Glu Leu Met Thr Ser Gly Thr Leu Lys Thr Tyr
 260 265 270
 Leu Lys Arg Phe Lys Val Met Lys Pro Lys Val Leu Arg Ser Trp Cys
 275 280 285
 Arg Gln Ile Leu Lys Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Arg Thr Pro Pro
 290 295 300
 Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Cys Asp Asn Ile Phe Ile Thr Gly Pro
 305 310 315 320
 Thr Gly Ser Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Thr Leu Lys Arg
 325 330 335
 Ala Ser Phe Ala Lys Ser Val Ile Gly Thr Pro Glu Phe Met Ala Pro
 340 345 350
 Glu Met Tyr Glu Glu His Tyr Asp Glu Ser Val Asp Val Tyr Ala Phe
 355 360 365
 Gly Met Cys Met Leu Glu Met Ala Thr Ser Glu Tyr Pro Tyr Ser Glu
 370 375 380
 Cys Gln Asn Ala Ala Gln Ile Tyr Arg Lys Val Thr Cys Gly Ile Lys
 385 390 395 400
 Pro Ala Ser Phe Glu Lys Val His Asp Pro Glu Ile Lys Glu Ile Ile
 405 410 415
 Gly Glu Cys Ile Cys Lys Asn Lys Glu Glu Arg Tyr Glu Ile Lys Asp
 420 425 430
 Leu Leu Ser His Ala Phe Phe Ala Glu Asp Thr Gly Val Arg Val Glu
 435 440 445
 Leu Ala Glu Glu Asp His Gly Arg Lys Ser Thr Ile Ala Leu Arg Leu
 450 455 460
 Trp Val Glu Asp Pro Lys Lys Leu Lys Gly Lys Pro Lys Asp Asn Gly
 465 470 475 480
 Ala Ile Glu Phe Thr Phe Asp Leu Glu Lys Glu Thr Pro Asp Glu Val
 485 490 495
 Ala Gln Glu Met Ile Glu Ser Gly Phe Phe His Glu Ser Asp Val Lys
 500 505 510
 Ile Val Ala Lys Ser Ile Arg Asp Arg Val Ala Leu Ile Gln Trp Arg
 515 520 525
 Arg Glu Arg Ile Trp Pro Ala Leu Gln Pro Lys Glu Gln Gln Asp Val
 530 535 540
 Gly Ser Pro Asp Lys Ala Arg Gly Pro Pro Val Pro Leu Gln Val Gln
 545 550 555 560
 Val Thr Tyr His Ala Gln Ala Gly Gln Pro Gly Pro Pro Glu Pro Glu
 565 570 575
 Glu Pro Glu Ala Asp Gln His Leu Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Ser

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

580          585          590
Ala Thr Ser Ser Leu Ala Ser Asp Ser Thr Phe Asp Ser Gly Gln Gly Ser
595          600          605
Thr Val Tyr Ser Asp Ser Gln Ser Ser Gln Gln Ser Val Met Leu Gly
610          615          620
Ser Leu Ala Asp Ala Ala Pro Ser Pro Ala Gln Cys Val Cys Ser Pro
625          630          635          640
Pro Val Ser Glu Gly Pro Val Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ser Leu Gly
645          650          655
Ala Tyr Gln Gln Pro Thr Ala Ala Pro Pro Pro Leu Ala Gln Pro Thr
660          665          670
Pro Leu Pro Gln Val Leu Ala Pro Gln Pro Val Val Pro Leu Gln Pro
675          680          685
Val Pro Pro His Leu Pro Pro Tyr Leu Ala Pro Ala Ser Gln Val Gly
690          695          700
Ala Pro Ala Gln Leu Lys Pro Leu Gln Met Pro Gln Ala Pro Leu Gln
705          710          715          720
Pro Leu Ala Gln Val Pro Pro Gln Met Pro Pro Ile Pro Val Val Pro
725          730          735
Pro Ile Thr Pro Leu Ala Gly Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro
740          745          750
Asp Leu Pro Thr Ala Thr Val Pro Pro Val Pro Pro Pro Gln Tyr Phe
755          760          765
Ser Pro Ala Val Ile Leu Pro Ser Leu Ala Ala Pro Leu Pro Pro Ala
770          775          780
Ser Pro Ala Leu Pro Leu Gln Ala Val Lys Leu Pro His Pro Pro Gly
785          790          795          800
Ala Pro Leu Ala Met Pro Cys Arg Thr Ile Val Pro Asn Ala Pro Ala
805          810          815
Thr Ile Pro Leu Leu Ala Val Ala Pro Pro Gly Val Ala Ala Leu Ser
820          825          830
Ile His Ser Ala Val Ala Gln Leu Pro Gly Gln Pro Val Tyr Pro Ala
835          840          845
Ala Phe Pro Gln Met Ala Pro Thr Asp Val Pro Pro Ser Pro His His
850          855          860
Thr Val Gln Asn Met Arg Ala Thr Pro Pro Gln Pro Ala Leu Pro Pro
865          870          875          880
Gln Pro Thr Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Thr Leu
885          890          895
Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Thr Arg Pro Pro Gln Pro
900          905          910
Val Leu Pro Pro Gln Pro Met Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro
915          920          925
Gln Pro Ala Leu Pro Val Arg Pro Glu Pro Leu Gln Pro His Leu Pro
930          935          940
Glu Gln Ala Ala Pro Ala Ala Thr Pro Gly Ser Gln Ile Leu Leu Gly
945          950          955          960
His Pro Ala Pro Tyr Ala Val Asp Val Ala Ala Gln Val Pro Thr Val
965          970          975
Pro Val Pro Pro Ala Ala Val Leu Ser Pro Pro Leu Pro Glu Val Leu
980          985          990
Leu Pro Ala Ala Pro Glu Leu Leu Pro Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ala
995          1000          1005
Thr Val Ser Ala Ser Val Gln Ser Val Pro Thr Gln Thr Ala Thr Leu
1010          1015          1020
Leu Pro Pro Ala Asn Pro Pro Leu Pro Gly Gly Pro Gly Ile Ala Ser
1025          1030          1035          1040
Pro Cys Pro Thr Val Gln Leu Thr Val Glu Pro Val Gln Glu Glu Gln
1045          1050          1055
Ala Ser Gln Asp Lys Pro Pro Gly Leu Pro Gln Ser Cys Glu Ser Tyr
1060          1065          1070

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Gly Gly Ser Asp Val Thr Ser Gly Lys Glu Leu Ser Asp Ser Cys Glu
 1075 1080 1085
 Gly Ala Phe Gly Gly Arg Leu Glu Gly Arg Ala Ala Arg Lys His
 1090 1095 1100
 His Arg Arg Ser Thr Arg Ala Arg Ser Arg Gln Glu Arg Ala Ser Arg
 1105 1110 1115 1120
 Pro Arg Leu Thr Ile Leu Asn Val Cys Asn Thr Gly Asp Lys Met Val
 1125 1130 1135
 Glu Cys Gln Leu Glu Thr His Asn His Lys Met Val Thr Phe Lys Phe
 1140 1145 1150
 Asp Leu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Glu Ile Ala Thr Tyr Met Val Glu
 1155 1160 1165
 His Asp Phe Ile Leu Gln Ala Glu Arg Glu Thr Phe Ile Glu Gln Met
 1170 1175 1180
 Lys Asp Val Met Asp Lys Ala Glu Asp Met Leu Ser Glu Asp Thr Asp
 1185 1190 1195 1200
 Ala Asp Arg Gly Ser Asp Pro Gly Thr Ser Pro Pro His Leu Ser Thr
 1205 1210 1215
 Cys Gly Leu Gly Thr Gly Glu Glu Ser Arg Gln Ser Gln Ala Asn Ala
 1220 1225 1230
 Pro Val Tyr Gln Gln Asn Val Leu His Thr Gly Lys Arg Trp Phe Ile
 1235 1240 1245
 Ile Cys Pro Val Ala Glu His Pro Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Ser
 1250 1255 1260
 Pro Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Pro Pro Glu Ala Ser Gln Asp Ser
 1265 1270 1275 1280
 Ala Pro Tyr Lys Asp Gln Leu Ser Ser Lys Glu Gln Pro Ser Phe Leu
 1285 1290 1295
 Ala Ser Gln Gln Leu Leu Ser Gln Ala Gly Pro Ser Asn Pro Pro Gly
 1300 1305 1310
 Ala Pro Pro Ala Pro Leu Ala Pro Ser Ser Pro Pro Val Thr Ala Leu
 1315 1320 1325
 Pro Gln Asp Gly Ala Ala Pro Ala Thr Ser Thr Met Pro Glu Pro Ala
 1330 1335 1340
 Ser Gly Thr Ala Ser Gln Ala Gly Gly Pro Gly Thr Pro Gln Gly Leu
 1345 1350 1355 1360
 Thr Ser Glu Leu Glu Thr Ser Gln Pro Leu Ala Glu Thr His Glu Ala
 1365 1370 1375
 Pro Leu Ala Val Gln Pro Leu Val Val Gly Leu Ala Pro Cys Thr Pro
 1380 1385 1390
 Ala Pro Glu Ala Ala Ser Thr Arg Asp Ala Ser Ala Pro Arg Glu Pro
 1395 1400 1405
 Leu Pro Pro Pro Ala Pro Glu Pro Ser Pro His Ser Gly Thr Pro Gln
 1410 1415 1420
 Pro Ala Leu Gly Gln Pro Ala Pro Leu Leu Pro Ala Ala Val Gly Ala
 1425 1430 1435 1440
 Val Ser Leu Ala Thr Ser Gln Leu Pro Ser Pro Pro Leu Gly Pro Thr
 1445 1450 1455
 Val Pro Pro Gln Pro Pro Ser Ala Leu Glu Ser Asp Gly Glu Gly Pro
 1460 1465 1470
 Pro Pro Arg Val Gly Phe Val Asp Ser Thr Ile Lys Ser Leu Asp Glu
 1475 1480 1485
 Lys Leu Arg Thr Leu Leu Tyr Gln Glu His Val Pro Thr Ser Ser Ala
 1490 1495 1500
 Ser Ala Gly Thr Pro Val Glu Val Gly Asp Arg Asp Phe Thr Leu Glu
 1505 1510 1515 1520
 Pro Leu Arg Gly Asp Gln Pro Arg Ser Glu Val Cys Gly Gly Asp Leu
 1525 1530 1535
 Ala Leu Pro Pro Val Pro Lys Glu Ala Val Ser Gly Arg Val Gln Leu
 1540 1545 1550
 Pro Gln Pro Leu Val Glu Lys Ser Glu Leu Ala Pro Thr Arg Gly Ala

WO 03/035840

PCT/US02/34037

1555 1560 1565
 Val Met Glu Gln Gly Thr Ser Ser Ser Met Thr Glu Ser Ser Pro Arg
 1570 1575 1580
 Ser Met Leu Gly Tyr Asp Arg Asp Gly Arg Gln Val Ala Ser Asp Ser
 1585 1590 1595 1600
 His Val Val Pro Ser Val Pro Gln Asp Val Pro Ala Phe Val Arg Pro
 1605 1610 1615
 Ala Arg Val Glu Pro Thr Asp Arg Asp Gly Gly Glu Ala Gly Glu Ser
 1620 1625 1630
 Ser Ala Glu Pro Pro Ser Asp Met Gly Thr Val Gly Gly Gln Ala
 1635 1640 1645
 Ser His Pro Gln Thr Leu Gly Ala Arg Ala Leu Gly Ser Pro Arg Lys
 1650 1655 1660
 Arg Pro Glu Gln Gln Asp Val Ser Ser Pro Ala Lys Thr Val Gly Arg
 1665 1670 1675 1680
 Phe Ser Val Val Ser Thr Gln Asp Glu Trp Thr Leu Ala Ser Pro His
 1685 1690 1695
 Ser Leu Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Asp Val Tyr Leu Asp Glu Ala Pro
 1700 1705 1710
 Ser Ser Pro Asp Val Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Gln Thr Ala Ser
 1715 1720 1725
 Ser Ile Glu Val Gly Val Gly Glu Pro Val Ser Ser Asp Ser Gly Asp
 1730 1735 1740
 Glu Gly Pro Arg Ala Arg Pro Pro Val Gln Lys Gln Ala Ser Leu Pro
 1745 1750 1755 1760
 Val Ser Gly Ser Val Ala Gly Asp Phe Val Lys Lys Ala Thr Ala Phe
 1765 1770 1775
 Leu Gln Arg Pro Ser Arg Ala Gly Ser Leu Gly Pro Glu Thr Pro Ser
 1780 1785 1790
 Arg Val Gly Met Lys Val Pro Thr Ile Ser Val Thr Ser Phe His Ser
 1795 1800 1805
 Gln Ser Ser Tyr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Ser Glu Leu Glu Asp Ala
 1810 1815 1820
 Asp Ile Lys Lys Glu Leu Gln Ser Leu Arg Glu Lys His Leu Lys Glu
 1825 1830 1835 1840
 Ile Ser Glu Leu Gln Ser Gln Gln Lys Gln Glu Ile Glu Ala Leu Tyr
 1845 1850 1855
 Arg Arg Leu Gly Lys Pro Leu Pro Pro Asn Val Gly Phe Phe His Thr
 1860 1865 1870
 Ala Pro Pro Thr Gly Arg Arg Lys Thr Ser Lys Ser Lys Leu Lys
 1875 1880 1885
 Ala Gly Lys Leu Leu Asn Pro Leu Val Arg Gln Leu Lys Val Val Ala
 1890 1895 1900
 Ser Ser Thr Gly His Leu Ala Asp Ser Ser Arg Gly Pro Pro Ala Lys
 1905 1910 1915 1920
 Asp Pro Ala Gln Ala Ser Val Gly Leu Thr Ala Asp Ser Thr Gly Leu
 1925 1930 1935
 Ser Gly Lys Ala Val Gln Thr Gln Gln Pro Cys Ser Val Arg Ala Ser
 1940 1945 1950
 Leu Ser Ser Asp Ile Cys Ser Gly Leu Ala Ser Asp Gly Gly Gly Ala
 1955 1960 1965
 Arg Gly Gln Gly Trp Thr Val Tyr His Pro Thr Ser Glu Arg Val Thr
 1970 1975 1980
 Tyr Lys Ser Ser Ser Lys Pro Arg Ala Arg Phe Leu Ser Gly Pro Val
 1985 1990 1995 2000
 Ser Val Ser Ile Trp Ser Ala Leu Lys Arg Leu Cys Leu Gly Lys Glu
 2005 2010 2015
 His Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ser Ser Leu Ala Pro Gly Pro Glu Pro
 2020 2025 2030
 Gly Pro Gln Pro Ala Leu His Val Gln Ala Gln Val Asn Asn Ser Asn
 2035 2040 2045

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Asn Lys Lys Gly Thr Phe Thr Asp Asp Leu His Lys Leu Val Asp Glu
 2050 2055 2060
 Trp Thr Ser Lys Thr Val Gly Ala Ala Gln Leu Lys Pro Thr Leu Asn
 2065 2070 2075 2080
 Gln Leu Lys Gln Thr Gln Lys Leu Gln Asp Met Glu Ala Gln Ala Gly
 2085 2090 2095
 Trp Ala Ala Pro Gly Glu Ala Arg Ala Met Thr Ala Pro Arg Ala Gly
 2100 2105 2110
 Val Gly Met Pro Arg Leu Pro Pro Ala Pro Gly Pro Leu Ser Thr Thr
 2115 2120 2125
 Val Ile Pro Gly Ala Ala Pro Thr Leu Ser Val Pro Thr Pro Asp Gly
 2130 2135 2140
 Ala Leu Gly Thr Ala Arg Arg Asn Gln Val Trp Phe Gly Leu Arg Val
 2145 2150 2155 2160
 Pro Pro Thr Ala Cys Cys Gly His Ser Thr Gln Pro Arg Gly Gly Gln
 2165 2170 2175
 Arg Val Gly Ser Lys Thr Ala Ser Phe Ala Ala Ser Asp Pro Val Arg
 2180 2185 2190
 Ser

<210> 6
 <211> 6582
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (6582)

<400> 6
 atg gag ccc ggg cgc gcc ggc ggc atg ggc gag cct cgg 48
 Met Glu Pro Gly Arg Gly Ala Gly Pro Ala Gly Met Ala Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 gcg aag gcg cgc cgg ccg ggg ccc cag cgc ttt ctg cgg cgc agc gtg 96
 Ala Lys Ala Ala Arg Pro Gly Pro Gln Arg Phe Leu Arg Arg Ser Val
 20 25 30
 gta gag tcg gac cag gag gag ccg ccg gcc ttg gag gca gcc gag gcg 144
 Val Glu Ser Asp Gln Glu Glu Pro Pro Gly Leu Glu Ala Ala Glu Ala
 35 40 45
 ccg gcc ccg cag ccc ccg cag ccc ctg cag cgc cgg gtg ctt ctg ctc 192
 Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Leu Gln Arg Arg Val Leu Leu Leu
 50 55 60
 tgc aag acg cgc cgc ctc atc gcg gag cgc gcc cgc gga cgc ccc gcc 240
 Cys Lys Thr Arg Arg Leu Ile Ala Glu Arg Ala Arg Gly Arg Pro Ala
 65 70 75 80
 gcc ccc gcg ccc gca gcg ctg gta gcg cag ccg gga gcc ccc gga gcc 288
 Ala Pro Ala Pro Ala Ala Leu Val Ala Gln Pro Gly Ala Pro Gly Ala
 85 90 95
 ccc gcg gac gcc gcc ccc gag ccc gtg gcc acg cag gag ccc gcc ccg 336
 Pro Ala Asp Ala Gly Pro Glu Pro Val Gly Thr Gln Glu Pro Gly Pro
 100 105 110
 gac ccc atc gca gcc gct gtc gaa acc gcg cct gcc ccc gac gcc gcc 384

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Asp Pro Ile Ala Ala Ala Val Glu Thr Ala Pro Ala Pro Asp Gly Gly
    115                      120                      125

ccc agg gag gag gcg gcg gct acc gtg agg aag gag gat gag ggg gcg 432
Pro Arg Glu Glu Ala Ala Ala Thr Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Ala
    130                      135                      140

gcc gag gcg aag cct gag ccc ggg cgc act cgc cgg gac gag ccc gaa 480
Ala Glu Ala Lys Pro Glu Pro Gly Arg Thr Arg Arg Asp Glu Pro Glu
    145                      150                      155                      160

gag gag gag gac gac gag gac gac ctc aag gcc gtg gcc acc tct ctg 528
Glu Glu Glu Asp Phe Glu Asp Asp Leu Lys Ala Val Ala Thr Ser Leu
    165                      170                      175

gac gcc cgc ttc ctc aag ttc gac atc gag ctg gcc cgc ggt tcc ttc 576
Asp Gly Arg Phe Leu Lys Phe Asp Ile Glu Leu Gly Arg Gly Ser Phe
    180                      185                      190

aag acg gtc tac aag ggg ctg gac acg gag acc tgg gtg gag gtg gcc 624
Lys Thr Val Tyr Lys Gly Leu Asp Thr Glu Thr Trp Val Glu Val Ala
    195                      200                      205

tgg tgt gag ctg cag gac cgg aag ctc acc aag ctg gag cgg cag cgg 672
Trp Cys Glu Leu Gln Asp Arg Lys Leu Thr Lys Leu Glu Arg Gln Arg
    210                      215                      220

ttc aag gaa gag gct gag atg ctg aaa gcc ctg cag cac ccc aac atc 720
Phe Lys Glu Glu Ala Glu Met Leu Lys Gly Leu Gln His Pro Asn Ile
    225                      230                      235                      240

gtg cgc ttc tac gac ttc tgg gag tcc agc gcc aag gcc aag cgg tgc 768
Val Arg Phe Tyr Asp Phe Trp Glu Ser Ser Ala Lys Gly Lys Arg Cys
    245                      250                      255

att gtg ctg gtg acg gag ctg atg acc tca ggg acg ctg aag aca tac 816
Ile Val Leu Val Thr Glu Leu Met Thr Ser Gly Thr Leu Lys Thr Tyr
    260                      265                      270

ctg aag cgg ttc aag gtg atg aag ccc aag gtt ctc cgc agc tgg tgc 864
Leu Lys Arg Phe Lys Val Met Lys Pro Lys Val Leu Arg Ser Trp Cys
    275                      280                      285

cgg cag atc ctg aag gcc ctg ctg ttc ctg cac aca agg acg cca ccc 912
Arg Gln Ile Leu Lys Gly Leu Leu Phe Leu His Thr Arg Thr Pro Pro
    290                      295                      300

atc atc cac cga gac ctg aaa tgt gac aat att ttc atc acc gga cca 960
Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Cys Asp Asn Ile Phe Ile Thr Gly Pro
    305                      310                      315                      320

act ggg tct gtg aag att ggc gac ttg ggc ctg gcc act ctg aaa aga 1008
Thr Gly Ser Val Lys Ile Gly Asp Leu Gly Leu Ala Thr Leu Lys Arg
    325                      330                      335

gcg tca ttt gcc aaa agt gtg ata ggt act ccc gag ttc atg gcg ccc 1056
Ala Ser Phe Ala Lys Ser Val Ile Gly Thr Pro Glu Phe Met Ala Pro
    340                      345                      350

gag atg tac gag gag cac tac gat gag tcc gtg gac gtc tat gcc ttt 1104
Glu Met Tyr Glu Glu His Tyr Asp Glu Ser Val Asp Val Tyr Ala Phe

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

355	360	365	
ggg atg tgc atg ctg gag atg gcc acc tgc gag tac ccc tac tgc gag Gly Met Cys Met Leu Glu Met Ala Thr Ser Glu Tyr Pro Tyr Ser Glu 370 375 380			1152
tgc cag aat gcg gcc cag atc tac cgc aag gtc acc tgt ggt atc aag Cys Gln Asn Ala Ala Gln Ile Tyr Arg Lys Val Thr Cys Gly Ile Lys 385 390 395 400			1200
cgc gcc agc ttt gag aaa gtg cac gat cct gaa atc aag gag att att Pro Ala Ser Phe Glu Lys Val His Asp Pro Glu Ile Lys Glu Ile Ile 405 410 415			1248
ggg gag tgt atc tgc aaa aac aag gag gaa agg tac gag atc aaa gac Gly Glu Cys Ile Cys Lys Asn Lys Glu Glu Arg Tyr Glu Ile Lys Asp 420 425 430			1296
ctg ctg agc cac gcc ttc ttc gca gag gac aca gcc gtg agg gtg gag Leu Leu Ser His Ala Phe Phe Ala Glu Asp Thr Gly Val Arg Val Glu 435 440 445			1344
ctc gcg gag gag gac cac gcc agg aag tcc acc atc gcc ctg agg ctc Leu Ala Glu Glu Asp His Gly Arg Lys Ser Thr Ile Ala Leu Arg Leu 450 455 460			1392
tgg gtg gaa gac ccc aag aaa ctg aag gga aag ccc aag gac aat gga Trp Val Glu Asp Pro Lys Lys Leu Lys Gly Lys Pro Lys Asp Asn Gly 465 470 475 480			1440
gcc ata gag ttc acc ttc gac ctg gag aag gag acg ccg gat gag gtg Ala Ile Glu Phe Thr Phe Asp Leu Glu Lys Glu Thr Pro Asp Glu Val 485 490 495			1488
gcc caa gag atg att gag tct gga ttc ttc cac gag agt gac gtc aag Ala Gln Glu Met Ile Glu Ser Gly Phe Phe His Glu Ser Asp Val Lys 500 505 510			1536
atc gtg gcc aag tcc atc cgt gac cgc gtg gcc ttg atc cag tgg cgg Ile Val Ala Lys Ser Ile Arg Asp Arg Val Ala Leu Ile Gln Trp Arg 515 520 525			1584
cgg gag agg atc tgg ccc gcg ctg cag ccc aag gag cag cag gat gtg Arg Glu Arg Ile Trp Pro Ala Leu Gln Pro Lys Glu Gln Gln Asp Val 530 535 540			1632
ggc agc ccg gac aag gcc agg ggt ccg ccg gtg ccc ctg cag gtc cag Gly Ser Pro Asp Lys Ala Arg Gly Pro Pro Val Pro Leu Gln Val Gln 545 550 555 560			1680
gtg acc tac cat gca cag gct ggg cag ccc ggg cca cca gag ccc gag Val Thr Tyr His Ala Gln Ala Gly Gln Pro Gly Pro Pro Glu Pro Glu 565 570 575			1728
gag ccg gag gcc gac cag cac ctc ctg cca cct acg ttg ccg acc agc Glu Pro Glu Ala Asp Gln His Leu Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Ser 580 585 590			1776
gcc acc tcc ctg gcc tgc gac agc acc ttc gac agc ggc cag ggc tct Ala Thr Ser Leu Ala Ser Asp Ser Thr Phe Asp Ser Gly Gln Gly Ser 595 600 605			1824

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

acc gtg tac tca gac tcg cag agc agc cag cag agc gtg atg ctt ggc 1872
Thr Val Tyr Ser Asp Ser Gln Ser Ser Gln Gln Ser Val Met Leu Gly
610 615 620

tcc ctt gcc gac gca gcg ccg tcc ccg gcc cag tgt gtg tgc agc ccc 1920
Ser Leu Ala Asp Ala Ala Pro Ser Pro Ala Gln Cys Val Cys Ser Pro
625 630 635 640

cct gtg agc gag ggg ccc gtc ctg ccg cag agc ctg ccc tcg ctg ggg 1968
Pro Val Ser Glu Gly Pro Val Leu Pro Gln Ser Leu Pro Ser Leu Gly
645 650 655

gcc tac cag cag ccc acg gct gca cct cct ccg ctg gcc cag ccg aca 2016
Ala Tyr Gln Gln Pro Thr Ala Ala Pro Pro Pro Leu Ala Gln Pro Thr
660 665 670

ccc ctg ccg cag gtc ctg gcc cca cag ccc gtg gtc ccc etc cag ccg 2064
Pro Leu Pro Gln Val Leu Ala Pro Gln Pro Val Val Pro Leu Gln Pro
675 680 685

gtt ccc ccc cac ctg cca ccg tac ctg gct cca gcc tcc cag gtg ggg 2112
Val Pro Pro His Leu Pro Pro Tyr Leu Ala Pro Ala Ser Gln Val Gly
690 695 700

gcc ccc gct cag ctg aag ccc ctc cag atg cca cag gcg ccc ctg cag 2160
Ala Pro Ala Gln Leu Lys Pro Leu Gln Met Pro Gln Ala Pro Leu Gln
705 710 715 720

ccg ctt gct caa gtc cct ccg cag atg ccc ccg att cct gtt gtg ccc 2208
Pro Leu Ala Gln Val Pro Pro Gln Met Pro Pro Ile Pro Val Val Pro
725 730 735

ccc atc acg ccc ctg gcg gga atc gac ggc etc cct ccg gcc etc cca 2256
Pro Ile Thr Pro Leu Ala Gly Ile Asp Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro
740 745 750

gac ctg ccg acc gcg act gtg cct ccc gtg cca cca cct cag tat ttc 2304
Asp Leu Pro Thr Ala Thr Val Pro Pro Val Pro Pro Pro Gln Tyr Phe
755 760 765

tct cca gcc gtg atc ttg ccg agc ctc gct gcc cca etc ccc cct gcg 2352
Ser Pro Ala Val Ile Leu Pro Ser Leu Ala Ala Pro Leu Pro Pro Ala
770 775 780

tcc cca gcc ttg cct ctg cag gct gtg aag ctg ccc cac ccc cct ggg 2400
Ser Pro Ala Leu Pro Leu Gln Ala Val Lys Leu Pro His Pro Pro Gly
785 790 795 800

gcg ccc ctg gcc atg ccc tgc ccg acc att gtg cca aat gca ccg gcc 2448
Ala Pro Leu Ala Met Pro Cys Arg Thr Ile Val Pro Asn Ala Pro Ala
805 810 815

act atc ccc ctg ctg gcc gta gcc cca ccg ggc gtg gct gcc ctg tcc 2496
Thr Ile Pro Leu Leu Ala Val Ala Pro Pro Gly Val Ala Ala Leu Ser
820 825 830

att cat tct gcc gtg gcc cag etc cca ggc caa cct gtg tac cca gcg 2544
Ile His Ser Ala Val Ala Gln Leu Pro Gly Gln Pro Val Tyr Pro Ala
835 840 845

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

gcc ttc cca cag atg gcg cct act gac gtc cct cct tcc ccc cat cac 2592
 Ala Phe Pro Gln Met Ala Pro Thr Asp Val Pro Pro Ser Pro His His
 850 855 860

acg gtg cag aat atg agg gcc acc cct cca cag cgg gca ctg cct cca 2640
 Thr Val Gln Asn Met Arg Ala Thr Pro Pro Gln Pro Ala Leu Pro Pro
 865 870 875 880

caa ccc aca ctg ccc cca caa ccc gtg ctg ccc cgg caa ccc acg ctg 2688
 Gln Pro Thr Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Thr Leu
 885 890 895

ccc cct caa cct gtg ttg ccc cgg caa ccc aca cgg ccc cct caa cct 2736
 Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro Gln Pro Thr Arg Pro Pro Gln Pro
 900 905 910

gtg ctg ccc cgg caa ccc atg ctg ccc cca caa cct gtg ctg ccc cgg 2784
 Val Leu Pro Pro Gln Pro Met Leu Pro Pro Gln Pro Val Leu Pro Pro
 915 920 925

cag cgg gca ctg cct gtg cgc cct gag ccc ctc cag ccc cac ctt cct 2832
 Gln Pro Ala Leu Pro Val Arg Pro Glu Pro Leu Gln Pro His Leu Pro
 930 935 940

gaa caa gct gct cca gct gct aca cca ggg agc cag att ctg ctt ggc 2880
 Glu Gln Ala Ala Pro Ala Ala Thr Pro Gly Ser Gln Ile Leu Leu Gly
 945 950 955 960

cac cca gct ccc tat gct gtg gac gtc gcc gct cag gtc ccc acc gtg 2928
 His Pro Ala Pro Tyr Ala Val Asp Val Ala Ala Gln Val Pro Thr Val
 965 970 975

cct gtg cca cgg gct gcg gtc ctc tcc cgg cct ctg cgg gaa gtg ctg 2976
 Pro Val Pro Pro Ala Ala Val Leu Ser Pro Pro Leu Pro Glu Val Leu
 980 985 990

ctg cct gcc gcc cct gag ctc ctg cct cag ttc ccc agc tcc ctg gcc 3024
 Leu Pro Ala Ala Pro Glu Leu Leu Pro Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ala
 995 1000 1005

acg gtg tct gcc tct gtg cag agt gtg ccc acc cag act gcc aca ctt 3072
 Thr Val Ser Ala Ser Val Gln Ser Val Pro Thr Gln Thr Ala Thr Leu
 1010 1015 1020

ctg cca cca gca aac cca cgg ctg cct ggc ggg ccc ggg atc gcc agc 3120
 Leu Pro Pro Ala Asn Pro Pro Leu Pro Gly Gly Pro Gly Ile Ala Ser
 1025 1030 1035 1040

cct tgc cca act gtc cag ctg acg gtg gaa cca gtc caa gag gag cag 3168
 Pro Cys Pro Thr Val Gln Leu Thr Val Glu Pro Val Gln Glu Glu Gln
 1045 1050 1055

gcc tca cag gac aag ccg ccc ggc ctc ccg cag agc tgt gag agc tat 3216
 Ala Ser Gln Asp Lys Pro Pro Gly Leu Pro Gln Ser Cys Glu Ser Tyr
 1060 1065 1070

gga ggt tct gat gtc act tct gga aaa gag ctg agt gac agc tgt gaa 3264
 Gly Gly Ser Asp Val Thr Ser Gly Lys Glu Leu Ser Asp Ser Cys Glu
 1075 1080 1085

ggc gcc ttt gga ggg ggc agg ctg gag ggc agg gca gcc cga aaa cac 3312

WO 03/035840

PCT/US02/34037

Gly Ala Phe Gly Gly Gly Arg Leu Glu Gly Arg Ala Ala Arg Lys His	
1090 1095 1100	
cac cgc agg tcc acg cgt gcg cgc tcc cgg cag gag agg gcc agc cgg	3360
His Arg Arg Ser Thr Arg Ala Arg Ser Arg Gln Glu Arg Ala Ser Arg	
1105 1110 1115 1120	
ccc cgg ctt acc atc ttg aac gtg tgc aac act ggg gac aag atg gtg	3408
Pro Arg Leu Thr Ile Leu Asn Val Cys Asn Thr Gly Asp Lys Met Val	
1125 1130 1135	
gag tgc cag ctg gag acg cac aac cac aag atg gtg acc ttc aag ttc	3456
Glu Cys Gln Glu Thr His Asn His Lys Met Val Thr Phe Lys Phe	
1140 1145 1150	
gac ttg gac ggg gac gca ccc gat gaa att gcc acg tat atg gtg gag	3504
Asp Leu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Glu Ile Ala Thr Tyr Met Val Glu	
1155 1160 1165	
cat gac ttt atc ctg cag gcc gag cgg gaa acg ttc atc gag cag atg	3552
His Asp Phe Ile Leu Gln Ala Glu Arg Glu Thr Phe Ile Glu Gln Met	
1170 1175 1180	
aag gat gtc atg gac aag gca gag gac atg ctc agc gag gac aca gac	3600
Lys Asp Val Met Asp Lys Ala Glu Asp Met Leu Ser Glu Asp Thr Asp	
1185 1190 1195 1200	
gcc gac cgt gcc tcc gac cca ggg acc agc ccg cca cac ctc agc acc	3648
Ala Asp Arg Gly Ser Asp Pro Gly Thr Ser Pro Pro His Leu Ser Thr	
1205 1210 1215	
tgc gcc ctg gcc acc ggg gag gag agc cga caa tcc caa gcc aac gcc	3696
Cys Gly Leu Gly Thr Gly Glu Glu Ser Arg Gln Ser Gln Ala Asn Ala	
1220 1225 1230	
ccc gtg tat cag cag aac gtc ctg cac acc ggg aag agg tgg ttc atc	3744
Pro Val Tyr Gln Gln Asn Val Leu His Thr Gly Lys Arg Trp Phe Ile	
1235 1240 1245	
atc tgt ccg gtg gct gag cac ccc gcc ccc gag gcc cct gaa tct tgg	3792
Ile Cys Pro Val Ala Glu His Pro Ala Pro Glu Ala Pro Glu Ser Ser	
1250 1255 1260	
ccc cca ctt cct cta agc tcc ctg ccg cca gaa gcc agc caa gat tca	3840
Pro Pro Leu Pro Leu Ser Ser Leu Pro Pro Glu Ala Ser Gln Asp Ser	
1265 1270 1275 1280	
gcg ccc tat aaa gac cag ctg tcc tgg aag gaa caa ccc agc ttt cta	3888
Ala Pro Tyr Lys Asp Gln Leu Ser Ser Lys Glu Gln Pro Ser Phe Leu	
1285 1290 1295	
gcc agt cag cag ctc ctg agc cag gcg gcc ccc agc aac cct cct ggg	3936
Ala Ser Gln Gln Leu Leu Ser Gln Ala Gly Pro Ser Asn Pro Pro Gly	
1300 1305 1310	
gca ccc cca gcc cct ttg gcc ccc tcc tcc cct cct gtg act gct ctg	3984
Ala Pro Pro Ala Pro Leu Ala Pro Ser Ser Pro Pro Val Thr Ala Leu	
1315 1320 1325	
ccc caa gat gga gca gct cca gcc acc agc acc atg cca gag cca gcg	4032
Pro Gln Asp Gly Ala Ala Pro Ala Thr Ser Thr Met Pro Glu Pro Ala	

WO 03/035840

PCT/US02/34037

1330	1335	1340	
tca gga act gcc agc cag gca ggg ggt cca ggg aca cct cag ggg ctg			4080
Ser Gly Thr Ala Ser Gln Ala Gly Gly Pro Gly Thr Pro Gln Gly Leu			
1345	1350	1355	1360
acc agt gag ctc gag acg tct cag cca cta gcg gag act cac gag gcc			4128
Thr Ser Glu Leu Glu Thr Ser Gln Pro Leu Ala Glu Thr His Glu Ala			
1365	1370	1375	
ccg ctt gct gtg cag ccc ctc gtg gtg ggc cta gca cct tgc act cca			4176
Pro Leu Ala Val Gln Pro Leu Val Val Gly Leu Ala Pro Cys Thr Pro			
1380	1385	1390	
gct cca gag gct gcc tca acc agg gac gcc agt gcc cca agg gag ccc			4224
Ala Pro Glu Ala Ala Ser Thr Arg Asp Ala Ser Ala Pro Arg Glu Pro			
1395	1400	1405	
ctg cca cct cct gca cct gag ccc agc ccc cac agc ggg acc cca cag			4272
Leu Pro Pro Pro Pro Ala Pro Glu Pro Ser Pro His Ser Gly Thr Pro Gln			
1410	1415	1420	
ccc gcc ttg ggt cag cct gct ccc ctg ctt cct gcc gca gtg ggg gcc			4320
Pro Ala Leu Gly Gln Pro Ala Pro Leu Leu Pro Ala Ala Val Gly Ala			
1425	1430	1435	1440
gtc agc ctg gcc acc tcc cag ctc cca agc cca ccc ctg ggg ccc acc			4368
Val Ser Leu Ala Thr Ser Gln Leu Pro Ser Pro Pro Leu Gly Thr Thr			
1445	1450	1455	
gtc ccc cca cag cca ccc tcg gcc ctg gag tcg gat ggg gaa ggg ccg			4416
Val Pro Pro Gln Pro Pro Ser Ala Leu Glu Ser Asp Gly Glu Gly Pro			
1460	1465	1470	
ccc ccc agg gtg ggc ttt gtg gac agc acc atc aag agc ctg gac gag			4464
Pro Pro Arg Val Gly Phe Val Asp Ser Thr Ile Lys Ser Leu Asp Glu			
1475	1480	1485	
aag ctg cgg act ctg ctc tac cag gag cac gtg ccc acc tcc tca gcc			4512
Lys Leu Arg Thr Leu Leu Tyr Gln Glu His Val Pro Thr Ser Ser Ala			
1490	1495	1500	
tca gct ggg acc cct gtg gag gtg ggc gac aga gac ttc acc ctg gag			4560
Ser Ala Gly Thr Pro Val Glu Val Gly Asp Arg Asp Phe Thr Leu Glu			
1505	1510	1515	1520
ccc ctg aga ggg gac cag ccc cgc tca gag gtc tgc ggg ggg gac ctg			4608
Pro Leu Arg Gly Asp Gln Pro Arg Ser Glu Val Cys Gly Gly Asp Leu			
1525	1530	1535	
gcc ctg ccc cca gtg cct aag gag gcg gtc tca ggg cgt gtc cag ctg			4656
Ala Leu Pro Pro Val Pro Lys Glu Ala Val Ser Gly Arg Val Gln Leu			
1540	1545	1550	
ccc cag ccc ttg gtg gag aag tca gaa ctg gcc ccc act cga ggg gcc			4704
Pro Gln Pro Leu Val Glu Lys Ser Glu Leu Ala Pro Thr Arg Gly Ala			
1555	1560	1565	
gtg atg gag cag ggc acg tcc tcg tca atg aca gag tcg tct ccc agg			4752
Val Met Glu Gln Gly Thr Ser Ser Met Thr Glu Ser Ser Pro Arg			
1570	1575	1580	

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

agt atg cta ggc tat gac aga gat gga agg cag gtg gcc tca gac tcc 4800
Ser Met Leu Gly Tyr Asp Arg Asp Gly Arg Gln Val Ala Ser Asp Ser
1585          1590          1595          1600

cat gtg gtc ccc agc gtc ccc cag gat gta cct gct ttt gtg aga cct 4848
His Val Val Pro Ser Val Pro Gln Asp Val Pro Ala Phe Val Arg Pro
1605          1610          1615

gca cgt gtg gag ccc aca gac agg gat ggt gga gaa gct gga gaa agc 4896
Ala Arg Val Glu Pro Thr Asp Arg Asp Gly Gly Glu Ala Gly Glu Ser
1620          1625          1630

tcg gca gag ccc ccg ccg agt gac atg ggc aca gtg ggg ggc cag gct 4944
Ser Ala Glu Pro Pro Pro Ser Asp Met Gly Thr Val Gly Gly Gln Ala
1635          1640          1645

agc cac ccc cag aca ctc ggc gct cga gct ttg ggg tcc cct cgg aaa 4992
Ser His Pro Gln Thr Leu Gly Ala Arg Ala Leu Gly Ser Pro Arg Lys
1650          1655          1660

cgt cca gag cag cag gat gtc agc tca cca gcc aag act gtg ggc cgt 5040
Arg Pro Glu Gln Gln Asp Val Ser Ser Pro Ala Lys Thr Val Gly Arg
1665          1670          1675          1680

ttc tcg gtg gtc agc act cag gac gag tgg acc ctg gcc tcc ccc cac 5088
Phe Ser Val Val Ser Thr Gln Asp Glu Trp Thr Leu Ala Ser Pro His
1685          1690          1695

agc ctg aga tac tct gcc cca ccc gac gtc tac ctg gac gag gcc ccc 5136
Ser Leu Arg Tyr Ser Ala Pro Pro Asp Val Tyr Leu Asp Glu Ala Pro
1700          1705          1710

tcc agc ccc gac gtg aag ctg gca gtg cgg cgg gcg cag acg gcc tcc 5184
Ser Ser Pro Asp Val Lys Leu Ala Val Arg Arg Ala Gln Thr Ala Ser
1715          1720          1725

tcc atc gag gtc gcc gtg gcc gag ccc gtg tcc agc gac tct ggg gac 5232
Ser Ile Glu Val Gly Val Gly Glu Pro Val Ser Ser Asp Ser Gly Asp
1730          1735          1740

gag gcc cct cgg gcg aga ccc ccg gtg cag aag cag gcg tcc ctg ccc 5280
Glu Gly Pro Arg Ala Arg Pro Pro Val Gln Lys Gln Ala Ser Leu Pro
1745          1750          1755          1760

gtg agt gcc agc gtg gct gcc gac ttc gtg aag aag gcc acc gcc ttc 5328
Val Ser Gly Ser Val Ala Gly Asp Phe Val Lys Lys Ala Thr Ala Phe
1765          1770          1775

ctg cag agg cct tct cgg gcc gcc tcg ctg gcc ccc gag aca ccc agc 5376
Leu Gln Arg Pro Ser Arg Ala Gly Ser Leu Gly Pro Glu Thr Pro Ser
1780          1785          1790

agg gtg gcc atg aag gtc ccc acg atc agc gtg acc tcc ttc cat tcc 5424
Arg Val Gly Met Lys Val Pro Thr Ile Ser Val Thr Ser Phe His Ser
1795          1800          1805

cag tcg tcc tac atc agc agc gac aat gat tcg gag ctg gag gat gct 5472
Gln Ser Ser Tyr Ile Ser Ser Asp Asn Asp Ser Glu Leu Glu Asp Ala
1810          1815          1820

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

gac ata aag aag gag ctg cag agt ctg cgg gag aag cac ctg aag gag 5520
 Asp Ile Lys Lys Glu Leu Gln Ser Leu Arg Glu Lys His Leu Lys Glu
 1825 1830 1835 1840
 atc tcg gag ctg cag agc cag cag aag cag gag atc gaa gct ctg tac 5568
 Ile Ser Glu Leu Gln Ser Gln Gln Lys Gln Glu Ile Glu Ala Leu Tyr
 1845 1850 1855
 cgc cgc ctg ggc aag cca ctg ccc ccc aac gtg ggc ttc ttc cac acg 5616
 Arg Arg Leu Gly Lys Pro Leu Pro Pro Asn Val Gly Phe Phe His Thr
 1860 1865 1870
 gca ccc ccc act ggc cgc cgg aga aaa acc agc aag agc aag ctg aag 5664
 Ala Pro Pro Thr Thr Gly Arg Arg Arg Lys Thr Ser Lys Ser Lys Leu Lys
 1875 1880 1885
 gca ggc aag ctg cta aat ccc ctg gtg cgg cag ctc aag gtc gtg gcc 5712
 Ala Gly Lys Leu Leu Asn Pro Leu Val Arg Gln Leu Lys Val Val Ala
 1890 1895 1900
 tcc agc aca ggt cac ttg gct gac tcc agc aga ggc cct ccc gct aag 5760
 Ser Ser Thr Gly His Leu Ala Asp Ser Ser Arg Gly Pro Pro Ala Lys
 1905 1910 1915 1920
 gac cct gcc caa gcc agt gtg ggg ctc act gca gac agc acg ggc ctg 5808
 Asp Pro Ala Gln Ala Ser Val Gly Leu Thr Ala Asp Ser Thr Gly Leu
 1925 1930 1935
 agc ggg aag gca gtg cag acc cag cag ccc tgc tcc gtc cgg gcc tcc 5856
 Ser Gly Lys Ala Val Gln Thr Gln Gln Pro Cys Ser Val Arg Ala Ser
 1940 1945 1950
 ctg tct tcg gac atc tgc tcc ggc tta gcc agt gat gga ggc gga gcg 5904
 Leu Ser Ser Asp Ile Cys Ser Gly Leu Ala Ser Asp Gly Gly Gly Ala
 1955 1960 1965
 cgt ggc caa ggc tgg acg gtt tac cac cca acg tct gag aga gtg acc 5952
 Arg Gly Gln Gly Trp Thr Val Tyr His Pro Thr Ser Glu Arg Val Thr
 1970 1975 1980
 tat aag tct agt agc aaa cct cgt gct cga ttc ctc agt gga ccc gta 6000
 Tyr Lys Ser Ser Ser Lys Pro Arg Ala Arg Phe Leu Ser Gly Pro Val
 1985 1990 1995 2000
 tct gtg tcc atc tgg tct gcc ctg aag cgt ctc tgc cta ggc aaa gaa 6048
 Ser Val Ser Ile Trp Ser Ala Leu Lys Arg Leu Cys Leu Gly Lys Glu
 2005 2010 2015
 cac agc agt agg tcc tcc acc agc agc ctg gcc cca ggc cct gag cca 6096
 His Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ser Ser Leu Ala Pro Gly Pro Glu Pro
 2020 2025 2030
 ggc ccc cag ccc gcc ctg cac gtc cag gcg cag gtg aac aac agc aac 6144
 Gly Pro Gln Pro Ala Leu His Val Gln Ala Gln Val Asn Asn Ser Asn
 2035 2040 2045
 aac aag aag ggt acc ttc acg gac gac ctg cac aag ctg gtg gac gag 6192
 Asn Lys Lys Gly Thr Phe Thr Asp Asp Leu His Lys Leu Val Asp Glu
 2050 2055 2060
 tgg acg agc aag acg gtg ggg gcc gcg cag ctg aag ccc acg ctc aac 6240

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

Trp Thr Ser Lys Thr Val Gly Ala Ala Gln Leu Lys Pro Thr Leu Asn
2065                2070                2075                2080

cag ctg aag cag acc cag aag ctg caa gac atg gag gcc cag gca ggc 6288
Gln Leu Lys Gln Thr Gln Lys Leu Gln Asp Met Glu Ala Gln Ala Gly
                2085                2090                2095

tgg gct gcc cct gcc gag gcg cgg gct atg acc gca cct cga gca gga 6336
Trp Ala Ala Pro Gly Glu Ala Arg Ala Met Thr Ala Pro Arg Ala Gly
                2100                2105                2110

gtg ggg atg cca cgt ctg ccc cca gcg ccc gcc cct ctg tcc acc acg 6384
Val Gly Met Pro Arg Leu Pro Pro Ala Pro Gly Pro Leu Ser Thr Thr
                2115                2120                2125

gtc att ccc gga gcc gcc ccg acc ctg tcc gtg ccc aca cca gat ggc 6432
Val Ile Pro Gly Ala Ala Pro Thr Leu Ser Val Pro Thr Pro Asp Gly
                2130                2135                2140

gcc ctg gga acc gcc cgg aga aac cag gtg tgg ttt gcc ctg cga gtc 6480
Ala Leu Gly Thr Ala Arg Arg Asn Gln Val Trp Phe Gly Leu Arg Val
2145                2150                2155                2160

ccc ccc acc gcc tgc tgt ggg cac agc act cag ccg cga ggg gga cag 6528
Pro Pro Thr Ala Cys Cys Gly His Ser Thr Gln Pro Arg Gly Gly Gln
                2165                2170                2175

cgg gtg gcc agc aag act gct tcc ttt gcg gct tca gac cct gtt cgc 6576
Arg Val Gly Ser Lys Thr Ala Ser Phe Ala Ala Ser Asp Pro Val Arg
                2180                2185                2190

tcc tag 6582
Ser *

```

<210> 7
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SH3 domain consensus sequence

```

<400> 7
Pro Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Glu Glu Ser Asp Glu
1          5          10          15
Leu Ser Phe Lys Lys Gly Asp Val Ile Thr Val Leu Glu Lys Ser Asp
20          25          30
Asp Trp Trp Lys Gly Arg Leu Lys Gly Thr Gly Gly Lys Glu Gly Leu
35          40          45
Val Pro Ser Asn Tyr Val Glu Pro Val
50          55

```

<210> 8
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

WO 03/035840

PCT/US02/34037

<220>

<223> 69583 protein kinase domain consensus sequence

<400> 8

```

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

```

<210> 9

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 85924 protein kinase domain consensus sequence

<400> 9

```

Tyr Glu Leu Leu Glu Lys Leu Gly Glu Gly Ser Phe Gly Lys Val Tyr
 1           5           10           15
Lys Ala Lys His Lys Thr Gly Lys Ile Val Ala Val Lys Ile Leu Lys
 20           25           30
Lys Glu Ser Leu Ser Leu Arg Glu Ile Gln Ile Leu Lys Arg Leu Ser
 35           40           45
His Pro Asn Ile Val Arg Leu Leu Gly Val Phe Glu Asp Thr Asp Asp
 50           55           60

```

WO 03/035840

PCT/US02/34037

```

His Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Met Glu Gly Gly Asp Leu Phe Asp
65      70      75      80
Tyr Leu Arg Arg Asn Gly Pro Leu Ser Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile
      85      90      95
Ala Leu Gln Ile Leu Arg Gly Leu Glu Tyr Leu His Ser Asn Gly Ile
      100     105     110
Val His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Glu Asn Gly
      115     120     125
Thr Val Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Leu Glu Lys Leu
      130     135     140
Thr Thr Phe Val Gly Thr Pro Trp Tyr Met Met Ala Pro Glu Val Ile
145     150     155     160
Leu Glu Gly Arg Gly Tyr Ser Ser Lys Val Asp Val Trp Ser Leu Gly
      165     170     175
Val Ile Leu Tyr Glu Leu Leu Thr Gly Gly Pro Leu Phe Pro Gly Ala
      180     185     190
Asp Leu Pro Ala Phe Thr Gly Gly Asp Glu Val Asp Gln Leu Ile Ile
      195     200     205
Phe Val Leu Lys Leu Pro Phe Ser Asp Glu Leu Pro Lys Thr Arg Ile
      210     215     220
Asp Pro Leu Glu Glu Leu Phe Arg Ile Lys Lys Arg Arg Leu Pro Leu
225     230     235     240
Pro Ser Asn Cys Ser Glu Glu Leu Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu
      245     250     255
Asn Lys Asp Pro Ser Lys Arg Pro Gly Ser Ala Thr Ala Lys Glu Ile
      260     265     270
Leu Asn His Pro Trp Phe
      275

```

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Protein kinase ATP binding region signature
sequence

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa at position 1 can be L, I or V

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa at position 3 can be A, E, Q, D, N, L, G, K,
S, V, R, T, I, M, F, Y, C, W or H

<221> VARIANT

<222> (5)...(5)

<223> Xaa at position 5 can be G, A, E, Q, D, N, L, K,
S, V, R, T, I, M, F, Y, C, W or H

<221> VARIANT

<222> (6)...(6)

<223> Xaa at position 6 can be F, Y, W, M, G, S, T, N or
H

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa at position 7 can be S, G or A

WO 03/035840

PCT/US02/34037

<221> VARIANT
<222> {8}...(8)
<223> Xaa at position 8 can be Q, A, E, D, N, L, G, K,
S, V, R, T, I, M, F, Y, C or H

<221> VARIANT
<222> {9}...(9)
<223> Xaa at position 9 can be L, I, V, C, A or T

<221> VARIANT
<222> {10}...(10)
<223> Xaa at position 10 can be Y, A, E, Q, N, L, G, K,
S, V, R, T, I, M, F, C, W or H

<221> VARIANT
<222> {11}...(11)
<223> Xaa at position 11 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> {12}...(12)
<223> Xaa at position 12 can be G, S, T, A, C, L, I, V,
M, F or Y

<221> VARIANT
<222> {13}...(18)
<223> Xaa at positions 13, 14, 15, 16, 17 and 18 can be
any amino acid

<221> VARIANT
<222> {19}...(19)
<223> Xaa at position 19 can be L, I, V, M, F, Y, W, C,
S, T, A or R

<221> VARIANT
<222> {20}...(20)
<223> Xaa at position 20 can be A, I, V or P

<221> VARIANT
<222> {21}...(21)
<223> Xaa at position 21 can be L, I, V, M, F, A, G, C,
K or R

<400> 10
Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
20

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tyrosine kinase phosphorylation site signature
sequence

<221> VARIANT

WO 03/035840

PCT/US02/34037

<222> (1)...(1)
<223> Xaa at position 1 can be R or K

<221> VARIANT
<222> (2)...(3)
<223> Xaa at positions 2 and 3 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa at position 4 can be D or E

<221> VARIANT
<222> (5)...(7)
<223> Xaa at positions 5, 6 and 7 can be any amino acid

<400> 11
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tyrosine kinase phosphorylation site signature
sequence

<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa at position 1 can be R or K

<221> VARIANT
<222> (2)...(4)
<223> Xaa at positions 2, 3 and 4 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> (5)...(5)
<223> Xaa at position 5 can be D or E

<221> VARIANT
<222> (6)...(7)
<223> Xaa at positions 6 and 7 can be any amino acid

<400> 12
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Serine/threonine protein kinase active site
signature sequence

<221> VARIANT
<222> (1)...(1)

WO 03/035840

PCT/US02/34037

<223> Xaa at position 1 can be L, I, V, M, F, Y or C

<221> VARIANT
<222> (2)...(2)
<223> Xaa at position 2 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> (3)...(3)
<223> Xaa at position 3 can be H or Y

<221> VARIANT
<222> (4)...(4)
<223> Xaa at position 4 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> (6)...(6)
<223> Xaa at position 6 can be L, I, V, M, F or Y

<221> VARIANT
<222> (8)...(9)
<223> Xaa at positions 8 and 9 can be any amino acid

<221> VARIANT
<222> (11)...(13)
<223> Xaa at positions 11, 12 and 13 can be L, I, V, M,
F, Y, C or T

<400> 13
Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Lys Xaa Xaa Asn Xaa Xaa Xaa
1 5 10

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/035840 A3

(51) International Patent Classification²: C12Q 1/48, 1/68,
G01N 33/53, C12N 5/16, 9/12, 15/52, C07H 21/04

(21) International Application Number:
PCT/US2002/034037

(22) International Filing Date: 24 October 2002 (24.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/538,690 24 October 2001 (24.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MIL-
LENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75
Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KAPELLER-
LIBERMANN, Rosana [BR/US]; 86 Beacon Street,
Chestnut Hill, MA 02467 (US); SPURLING, Heidi, Lynn
[US/US]; 718 Salem Street, Apartment 3, Malden, MA
02148 (US).

(74) Agent: SIOUSSAT, Tracy, M.; Intellectual Property
Group, Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney
Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (uti-
lity model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (uti-
lity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), 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 (utility model), SK, SL, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
26 February 2004

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 2003/035840 A3

(54) Title: 69583 AND 85924, NOVEL HUMAN PROTEIN KINASE FAMILY MEMBERS AND USES THEREFOR

(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated 69583 and 85924 nucleic acid molecules, which encode novel protein kinase family members. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing 69583 or 85924 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and nonhuman transgenic animals in which a 69583 or 85924 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated 69583 or 85924 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-69583 or -85924 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/US02/34037												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/48; 1/68; G01N 33/53; C12N 5/16; 9/12; 15/52; C07H 21/04 US CL. : 435/6; 7.1; 15; 194; 252.3; 320.1; 325; 536/23.2; 23.4; 23.5 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. : 435/6; 7.1; 15; 194; 252.3; 320.1; 325; 536/23.2; 23.4; 23.5 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.												
X	WO 01/55336 A2 (PLOWMAN et al) 2 August 2001 (02.08.2001), page 132, claims 1-9, 13, 14, 21; SEQ ID NO:23; SEQ ID NO: 55 (719 amino acids, 100% identical to 1-719 of SEQ ID NO:2).	1d, 5-9, 10b, 14, 19b, 23-27, 29												
P, X -- P, Y	Database GenBank (National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA). Accession No. AJ311798. Kvasha et al., 12 December 2001 (12.12.2001). Encodes 1036 amino acids that are 98.7% identical to SEQ ID NO:2 (12 mismatches).	1-3, 5, 7, 10-12, ----- 19, 23-27, 29												
P, X	WO 02/50105 A1 (SMITHLINE BEECHAM CORPORATION) 27 June 2002 (27.06.2002), SEQ ID NO:87 (1021 amino acids that are 97.9% identical to SEQ ID NO:2), claim 1, pages 307-309.	1-3, 5-12, 14, 19, 23-27, 29												
P, X	US 2002/0107384 A1 (HU et al) 08 August 2002 (08.08.2002), entire document, SEQ ID NO:2 (1036 amino acids that are 99.5% identical to SEQ ID NO:2, 5 mismatches).	1-3, 5-12, 14, 19, 23-27, 29												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.														
<table border="0"><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>*Y* later documents 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>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</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>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td><td>*V* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</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>*B* document member of the same patent family</td></tr><tr><td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></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>			* Special categories of cited documents:	*Y* later documents 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	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*V* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*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)	*B* document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
* Special categories of cited documents:	*Y* later documents 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													
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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													
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*V* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
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)	*B* document member of the same patent family													
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means														
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 24 September 2003 (24.09.2003)		Date of mailing of the international search report 26 NOV 2003												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Elizabeth Stodolny Telephone No. 703-308-0196												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/34037
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-14, 19, 23-27, 29, species of SEQ ID NOs: 1, 2
Remark on Protest	☐	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	☐	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/34037

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-14, 19, 23-27 and 29 (all in part), drawn to a DNA encoding a polypeptide of SEQ ID NO:2, a vector and a host cell comprising thereof, methods of use of said DNA, a polypeptide of SEQ ID NO:2, methods of making and use thereof.

Group II, claim(s) 1-14, 19, 23-27 and 29 (all in part), drawn to a DNA encoding a polypeptide of SEQ ID NO:5, a vector and a host cell comprising thereof, methods of use of said DNA, a polypeptide of SEQ ID NO:5, methods of making and use thereof.

Group III, claim(s) 15-18, 20-22 and 28 (all in part), drawn to an antibody against a polypeptide of SEQ ID NO:2, methods of use thereof and a kit comprising thereof.

Group IV, claim(s) 15-18, 20-22 and 28 (all in part), drawn to an antibody against a polypeptide of SEQ ID NO:5, methods of use thereof and a kit comprising thereof.

The technical feature linking Groups I-IV appears to be a human protein kinase.

The inventions listed as Groups I-IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: human protein kinases are known in the art. Dorow et al. (Eur. J. Biochem., Vol. 234, pages 492-500, 1995) teach a human protein kinase (entire document). Furthermore, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5 do not appear to share common structure or common structural element since the sequence homology between SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:5 is about 10%.

In addition, an antibody against SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO:5 lacks common structure or common structural element with a polypeptide of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:5, respectively, and it is not used in methods of inventions of Groups I and II. Since the technical feature linking Groups I-IV does not define a contribution over the prior art, the claimed inventions do not meet the requirement of unity of invention under PCT Rule 13.2.

Continuation of B, FIELDUS SEARCHED Item 3:
WEST, STN (MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, SCISEARCH)
search terms: protein kinase, mlk, human, DNA, nucle?

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/12	C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ポケットベル

(72)発明者 カペラリバーマン, ロザナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 6 7, チェストナット ヒル, ベーコン ストリ
ート 8 6

(72)発明者 スプーリング, ハイディ リン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 8, マルデン, サイレム ストリート 7 1 8
, アpartment 3

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 DA37 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 CA09 CA11 DA02 DA05 DA11 EA02
EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA11
4B050 CC01 CC03 DD07 LL01 LL03
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ13 QQ27 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42
QR55 QR57 QR59 QR62 QR74 QR80 QS05 QS25 QS26 QS36
QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA25 CA29
CA44 CA46
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	69583和85924，新型人类蛋白激酶家族成员及其用途		
公开(公告)号	JP2005508168A	公开(公告)日	2005-03-31
申请号	JP2003538341	申请日	2002-10-24
[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	カベラリバーマンロザナ スプーリングハイディリン		
发明人	カベラリバーマン, ロザナ スプーリング, ハイディ リン		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/40 C07K16/46 C12N5/10 C12N9/12 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C12N9/1205		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C07K16/40 C07K16/46 C12N9/12 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ27 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS26 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA29 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/338690 2001-10-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了编码新蛋白激酶家族成员的分离的核酸分子（称为69583核酸分子和85924核酸分子）。本发明还提供了重组表达载体，其包含反义核酸分子，69583核酸分子或85924核酸分子，引入表达载体的宿主细胞，和引入69583基因或85924基因的非人转基因动物。它被摧毁或毁坏）。本发明还进一步提供了分离的69583或85924蛋白，融合蛋白，抗原肽和抗69583抗体或抗85924抗体。还提供了利用本发明组合物的诊断和治疗方法。

遺伝子	cDNA	ORF	ポリペプチド
69583	配列番号 1	配列番号 3	配列番号 2
85924	配列番号 4	配列番号 6	配列番号 5