

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522408

(P2004-522408A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

| (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 | A 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 45/00 | A 6 1 K 45/00 | 4 B 0 6 3 |
| A 6 1 P 25/28 | A 6 1 P 25/28 | 4 B 0 6 4 |
| C 0 7 K 14/705 | C 0 7 K 14/705 | 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 P 21/02 | C 1 2 P 21/02 | C 4 H 0 4 5 |

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 164 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2001-582501 (P2001-582501) | (71) 出願人 | 502019966 エクセリクシス・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、94083-0511 カリフォルニア州、サウス・サン・フランシスコ、ハーバー・ウェイ、170 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年5月3日(2001.5.3) | (74) 代理人 | 100109726 弁理士 園田 吉隆 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成14年11月5日(2002.11.5) | (74) 代理人 | 100101199 弁理士 小林 義教 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/014648 | (72) 発明者 | カーティス, ダニエル, ティム アメリカ合衆国 カリフォルニア 94083-0511, サウス サンフランシスコ, ハーバー ウェイ 170, ビー. オー. ボックス 511 エクセリクシス, インコーポレイテッド内 |
| (87) 国際公開番号 | W02001/085912 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成13年11月15日(2001.11.15) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 09/568, 942 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年5月5日(2000.5.5) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プレセニリンエンハンサー

(57) 【要約】

本発明は p e n 特異的構造及び活性を有する p e n ポリペプチド、関連ポリヌクレオチド及び p e n 機能のモジュレーターに関する方法及び組成物を提供する。本発明は、天然 p e n 遺伝子と特異的にハイブリダイズする能力のある単離された p e n ハイブリダイゼーションプローブ及びプライマー、p e n 特異的結合をする薬剤、例えば特異的抗体、並びに診断（例えば p e n 転写物の遺伝子ハイブリダイゼーションスクリーニング）、治療（例えば、A P P 生成を調節する p e n 阻害物質）及び生物薬剤産業（例えば、免疫原、リード薬物の化学ライブラリをスクリーニングするための試薬等）における対象組成物を製造及び使用する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

Notch又はAPPプロセッシングとプレセニリンエンハンサー(pen)ポリペプチドの機能的相互作用を変化させるストレスを特異的に検出するための方法であって、
Notch又はAPPプロセッシングとpenポリペプチドの機能的相互作用を提供するシステムに所定のストレスを導入し、それによって、システムはNotch又はAPPプロセッシングとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を提供し、ストレスのない場合にシステムはNotch又はAPPプロセッシングとpenポリペプチドの不偏性相互作用を提供し；及び

Notch又はAPPプロセッシングとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を検出して、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異によって、ストレスがNotch又はAPPプロセッシングとpenポリペプチドの相互作用を変化させることを示すことを含み、

システムは：(i) penポリペプチド発現が非天然又は病原性であると決定されるpenポリペプチドを発現する生細胞、及び(ii)規定量のpenポリペプチドを含有するインビトロ無細胞混合物からなる群から選択され、

penポリペプチドは、ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ、及び線虫のpen-2；ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫のpen-1；及びヒトのpen-1Bからなる群から選択されるpenポリペプチドと配列類似性を有し、類似性が少なくとも20%同一性である方法。

【請求項2】

APPプロセッシングとプレセニリン(pen)ポリペプチドのエンハンサーの機能的相互作用を変化させるストレスを特異的に検出するための方法であって、

APPプロセッシングとpenポリペプチドの機能的相互作用を提供するシステムに所定のストレスを導入し、それによって、システムはAPPプロセッシングとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を提供し、ストレスのない場合にシステムはAPPプロセッシングとpenポリペプチドの不偏性相互作用を提供し；及び

APPプロセッシングとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を検出して、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異によって、ストレスがAPPプロセッシングとpenポリペプチドの相互作用を変化させることを示すことを含み、

システムは：(i) penポリペプチド発現が非天然又は病原性であると決定されるpenポリペプチドを発現する生細胞、及び(ii)規定量のpenポリペプチドを含有するインビトロ無細胞混合物からなる群から選択され、

penポリペプチドは、ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ、及び線虫のpen-2；ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫のpen-1；ヒトのpen-1B；及びヒト、キイロショウジョウバエ又は線虫のAph-2からなる群から選択されるpenポリペプチドと配列類似性を有し、類似性が少なくとも20%同一性である方法。

【請求項3】

プレセニリンとプレセニリンエンハンサー(pen)ポリペプチドの機能的相互作用を変化させるストレスを特異的に検出するための方法であって、

プレセニリンとpenポリペプチドの機能的相互作用を提供するシステムに所定のストレスを導入し、それによって、システムはプレセニリンとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を提供し、ストレスのない場合にシステムはプレセニリンとpenポリペプチドの不偏性相互作用を提供し；及び

システム内でのプレセニリンの量の変化としてプレセニリンとpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を検出し、その量はプレセニリンN又はC末端断片(NTFs)、プレセニリンホロタンパク質、又はその割合の量として表されてもよく、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異によって、ストレスがプレセニリンとpenポリペプチドの相互作用を変化させることを示すことを含み、

10

20

30

40

50

システムは：(i) penポリペプチド発現が非天然又は病原性であると決定される penポリペプチドを発現する生細胞、及び(ii)規定量の penポリペプチドを含有するインビトロ無細胞混合物からなる群から選択され、

penポリペプチドは、ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ、及び線虫の pen-2；ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の pen-1；及びヒトの pen-1B からなる群から選択される penポリペプチドと配列類似性を有し、類似性が少なくとも20%同一性である方法。

【請求項4】

penポリペプチドが、ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の pen-2 からなる群から選択される、請求項1、2又は3に記載の方法。

10

【請求項5】

penポリペプチドが、ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の pen-1 からなる群から選択される、請求項1、2又は3に記載の方法。

【請求項6】

penポリペプチドが、ヒトの pen-1B である、請求項1、2又は3に記載の方法。

【請求項7】

前記 penポリペプチドが、sel-12 (デルタ)ホモ接合線虫遺伝子突然変異エンハンサースクリーニングにおいて天然に生じる penポリペプチドである、請求項1、2又は3に記載の方法。

【請求項8】

同一性が少なくとも50%である、請求項1、2、3、4、5、6又は7に記載の方法。

20

【請求項9】

同一性が100%である、請求項1、2、3、4、5、6又は7に記載の方法。

【請求項10】

機能的相互作用が、Notch又はAPPプロセシングの構成要素と penポリペプチドの結合を含む、請求項1、4、5、6、7、8又は9に記載の方法。

【請求項11】

機能的相互作用が、Notch又はAPPプロセシングの構成要素と penポリペプチドの結合を含み、構成要素がプレセニリン又は分泌酵素である、請求項1、4、5、6、7、8又は9に記載の方法。

30

【請求項12】

システムが生細胞であり、ストレスが薬理学的活性剤である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項13】

システムが生細胞であり、ストレスが penポリペプチドの機能的発現における欠陥である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項14】

システムが生細胞であり、ストレスが penポリペプチドをコードする他の内因性対立遺伝子のゲノム破壊による penポリペプチドの機能的発現における欠陥である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

40

【請求項15】

システムが生細胞であり、ストレスが penポリペプチドをコードする内因性対立遺伝子の配列アンチセンスを含むポリヌクレオチドの共発現による penポリペプチドの機能的発現における欠陥である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項16】

システムが生細胞であり、細胞がインサイツ(動物宿主内にある)である、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項17】

システムが生細胞であり、細胞がインビトロ(動物宿主から単離された)である、請求項

50

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項18】

システムがインビトロ無細胞混合物であり、ストレスが薬理的活性剤である、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項19】

検出工程がアルツハイマー病の徴候を検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項20】

検出工程が notch の転写レポーターを検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

10

【請求項21】

検出工程が A₂（ベータ）の生成を検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項22】

検出工程が、A₂（ベータ）の生成を A₂ 特異的抗体を用いて検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項23】

検出工程が pen ポリペプチドの構造変化を検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項24】

検出工程が、pen ポリペプチドの構造変化を pen ポリペプチド特異的抗体を用いて検出する、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

20

【請求項25】

検出可能なプレセニリンの量の変化が、プレセニリン特異的抗体により検出される、請求項3に記載の方法。

【請求項26】

システムが生細胞であり、分泌酵素レポーターを含む、請求項1、2、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項27】

システムが生細胞であり、C末端 APP - Gal4 融合タンパク質及び UAS レポーター導入遺伝子を含む分泌酵素レポーターを含み、分泌酵素による融合タンパク質の切断が Gal4 を遊離し、次にレポーターを発現する導入遺伝子の転写を活性化する、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

30

【請求項28】

pen ポリペプチドが、ヒト、キイロショウジョウバエ又は線虫の Aph - 2 からなる群から選択される、請求項2、3、4、5、6、7、8、9、10、又は11に記載の方法。

【請求項29】

配列番号：1に対して少なくとも50%の配列類似性を有する配列を含み、ポリペプチド又は断片がヒト pen - 1 B 特異的抗体と交差反応する、単離されたポリペプチド。

40

【請求項30】

ポリペプチドが、ヒトプレセニリン又は分泌酵素と結合する、請求項28に記載のポリペプチド。

【請求項31】

配列番号：6、残基1 - 14；配列番号：6、残基6 - 15；配列番号：6、残基10 - 20；配列番号：6、残基25 - 46；配列番号：6、残基62 - 71；配列番号：6、残基67 - 76；配列番号：6、残基72 - 95；配列番号：6、残基115 - 126；配列番号：6、残基130 - 140；配列番号：6、残基139 - 151；配列番号：6、残基166 - 182；配列番号：6、残基184 - 198；配列番号：6、残基214 - 232；及び配列番号：6、残基246 - 257からなる群から選択されるアミノ酸配

50

列を含む、請求項 29 又は 30 に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

配列番号：2 - 10 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 33】

配列番号：6、残基 1 - 254；配列番号：6、残基 4 - 255；配列番号：6、残基 9 - 257；及び配列番号：6、残基 2 - 255 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

配列番号：2 を含む請求項 29 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 35】

請求項 29、30、31、32、33 又は 34 に記載のポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 36】

ベクター又は細胞内に含まれる請求項 29、30、31、32、33 又は 34 に記載のポリペプチドをコードする組み換えポリヌクレオチド。

【請求項 37】

ポリペプチドを作成する方法であって、宿主細胞又は細胞抽出物中に請求項 29、30、31、32、33 又は 34 に記載のポリヌクレオチドを導入し、前記宿主細胞又は抽出物を、前記ポリヌクレオチドが転写物として発現され、前記転写物が前記ポリペプチドを含む翻訳産物として発現される条件下でインキュベートする工程を含む方法。

20

【請求項 38】

結合標的に対する pen - 1 B ポリペプチドの相互作用を調節する薬剤のスクリーニング方法であって、

請求項 29、30、31、32、33 又は 34 に記載の単離されたポリペプチド、

前記ポリペプチドの結合標的、及び

候補薬剤

を含む混合物を、前記薬剤が存在しない場合には前記ポリペプチドが基準親和性で前記結合標的に特異的に結合する条件下でインキュベートし；

前記結合標的に対する前記ポリペプチドの結合親和性を検出して薬剤偏向性親和性を測定する工程を含み、

30

薬剤偏向性親和性と基準親和性の間の差異によって、前記薬剤が前記結合標的に対する前記ポリペプチドの結合を調節することを示す方法。

【請求項 39】

前記結合標的がヒトプレセニン又は 分泌酵素を含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

結合標的に対する pen - 1 B ポリペプチドの相互作用を調節する薬剤のスクリーニング方法であって、

請求項 29、30、31、32、33 又は 34 に記載のポリヌクレオチドをポリペプチドが発現される条件下でインキュベートし；

40

前記ポリペプチドを含む混合物、前記ポリペプチドの結合標的、及び候補薬剤を含む混合物を、前記薬剤が存在しない場合には前記ポリペプチドが基準親和性で前記結合標的に特異的に結合する条件下でインキュベートし；

前記結合標的に対する前記ポリペプチドの結合親和性を検出して薬剤偏向性親和性を測定する工程を含み、

薬剤偏向性親和性と基準親和性の間の差異によって、前記薬剤が前記結合標的に対する前記ポリペプチドの結合を調節することを示す方法。

【請求項 41】

前記ポリヌクレオチドが細胞内にある、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

50

前記結合標的がプレセニリン又は 分泌酵素を含む、請求項 40 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(導入)

(発明の分野)

本発明の分野は、プレセニリン機能を調節するタンパク質である。

【0002】

(背景)

アルツハイマー病は、中年から後年において記憶障害及び認知低下を引き起こす中枢神経系の変性疾患である。疾患は2つの主な病理学的特徴、脳内の細胞外アミロイドプラークとニューロン内神経原繊維変化により特徴づけられる。これらの障害は神経及びグリア細胞の機能を阻害し、シナプスの減少および痴呆を引き起こす。早発性及び遅発性発症のどちらの型の疾患も遺伝的な要素を有していることが示されており、4つの遺伝子がADの増大したリスクに決定的に関連している：APP、PS1、PS2及びApoE。これらの遺伝子は、最終的にアミロイド (A)、アルツハイマーアミロイドプラークの主要成分の生成、輸送、及び/又は排除の役割に機能的に関連している (Selkoe, D. 1999, Nature 399 supp: A23参照)。

10

【0003】

アルツハイマーアミロイドプラークは、大部分、40-42のアミノ酸ペプチドAから成る (Glennner, G. G., 及び Wong, C. W., 1984 Biochem. Biophys. Res. Commun. 122: 1131)。Aはbアミロイド前駆体タンパク質、又はAPPからタンパク質分解性の切断により誘導される (Kang J. 等 1987, Nature 325: 733)。3つの分泌酵素活性はAPPを切断してAペプチド又はより短いp3と呼ばれる別の断片産物を生成する。

20

分泌酵素はAのN末端を生成するが、分泌酵素はA配列を内部切断してp3のN末端を生成する。分泌酵素は、APPのC末端及び分泌酵素産物を切断してA及びp3の異質性のC末端を生成する。家族性アルツハイマー病 (FAD) 系統に見られるAPP突然変異は、3つの分泌酵素切断部位の周りに集まり (Goate, A. 等 1991, Nature 349: 704; Murrell, J., 等 1991, Science 254: 97; Chartier-Harlin 等 1991, Nature 353: 844; Mullan, M. 等 1992, Nature Genet. 1: 345; Levy, E. 等, 1990, Science 248: 1124; Hendriks, L. 等 1992, Nature Genet. 1: 218)、それらはそれぞれ全A (A₄₂+A₄₀)を増加するか、又はA₄₂/40の割合を増加する。A₄₂はインビトロでより敏速に沈殿し、びまん性老人斑と呼ばれるアミロイド沈着の素早い形成の主要成分であるため、増加した全身性のA₄₂はプラークのより早い形成、ADのより早い発症を引き起こしうる。

30

【0004】

家族研究によって優性遺伝、早期発症ADに関連する他の2つの遺伝子、プレセニリン1 (PS1) 及びプレセニリン2 (PS2) が同定された (Sherrington, R. 等 1995, Nature 375: 754; Levy-Lahad, E. 等 1995, Science 269: 973; Rogaev, E. I. 等 1995, Nature 376: 775)。これらのタンパク質は、配列において互いに類似し、8つの膜貫通セグメントを有するポリトピック膜タンパク質をコードする。FADヒト細胞株、トランスフェクト細胞、及び遺伝子導入マウスの研究によって、PS FAD突然変異がAPPのプロセッシングパターンに変化を生じさせ、A₄₂/40の割合を増加させることが説明された (Scheuner, D. 等 1996, Nat. Med. 2: 864; Citron, M. 等 1997, Nat. Med. 3: 67; Borchel, D. 等 1996, Neuron 17: 1005; Duff, K. 等 1996, Nature 383: 710; Tomita, T. 等 1997, P

40

50

N A S 9 4 : 2 0 2 5)。P S 1 ノックアウトマウスの研究によって、P S 1 機能の低下は 分泌酵素活性の減少による A 生成の減少を引き起こすことが説明された (D e S t r o o p e r , B . 等 1 9 9 8 , N a t u r e 3 9 1 : 3 8 7)。従ってプレセニリン機能は2つの経路:ミスセンス突然変異が 分泌酵素切断特異性を変化させること、さらにプレセニリン活性の低下が 分泌酵素活性の低下を引き起こすことで、 分泌酵素の活性に関与する。

【0005】

プレセニリン活性の阻害は、A 生成を減少させ、従ってアルツハイマー病に対する潜在的に有用な治療アプローチである。しかしながら、 分泌酵素活性とA の生成に対する機能的な関与にも関わらず、P S 活性の生物学的性質はあまり分かっていない。E R 及び / 又はゴルジ複合体でのA P P、N o t c h、及び / 又は 分泌酵素のシャペロンとしての作用 (T h i n a k a r a n , G . 等 1 9 9 8 , N e u r o b i o l . D i s . 4 : 4 3 8)、新規なアスパルチルプロテアーゼとしての、すなわちそれ自体の 分泌酵素としての活性 (W o l f e , M . S . 等 1 9 9 9 , N a t u r e 3 9 8 : 5 1 3)、及び酸化ストレス及びアポトーシスに対する反応における潜在的な役割 (W o l o z i n , B . 等 1 9 9 6 , S c i e n c e 2 7 4 : 1 7 1 0 ; v i t o , P . 等 1 9 9 7 , J . B i o l . C h e m 2 7 2 : 2 8 3 1 5 ; G u o , Q . , 等 1 9 9 7 , J . N e u r o s c i . 1 7 : 4 2 1 2) を含む様々な機能が提案されている。明確な機能的アッセイがないことは、プレセニリンを対象とする有用な小分子治療学の確立の困難性を増大させる。プレセニリンを対象とする代替りの方法は、 分泌酵素及びA 生成の経路においてプレセニリンと共に作用し、薬剤の開発にさらに受け入れられやすい更なるタンパク質を見つけねばならない。このような新規な対象の発見に利用できる方法の1つは、ショウジョウバエ及び線虫等のモデル生物でプレセニリンと相互作用する遺伝子の遺伝子スクリーニングを行うことである。

【0006】

P S 遺伝子の無脊椎動物オルソログが、配列検索及び遺伝子スクリーニングの両方により同定されている。線虫のゲノムは、3つのプレセニリン遺伝子、s e l - 1 2 (l i n - 1 2 のサブレッサー及び / 又はエンハンサー; L e v i t a n , D . 等 1 9 9 5 , N a t u r e 3 7 7 : 3 5 1)、h o p - 1 (プレセニリンのホモログ; L i , X . 等 , 1 9 9 7 , P N A S 9 4 : 1 2 2 0 4) 及び s p e - 4 (精子形成欠陥; L ' H e r n a u l t 等 , 1 9 9 2 , J . C e l l B i o l . 1 1 9 : 5 5) を含む。s e l - 1 2、h o p - 1 及び s p e - 4 はそれぞれ、P S 1 及び2と48、35及び23%の配列類似性を有する。s e l - 1 2 及び h o p - 1 は幾つかの組織で重複した機能を有し (下記参照)、さらに s p e - 4 はオスの生殖系列で独立した機能を果たすようである。導入遺伝子を用いたレスキュー実験により、ヒトP S 1 及びP S 2 は s e l - 1 2 の低下により生じる表現型を救済することができることが示され、プレセニリン機能が線形動物から哺乳動物まで保存されていることを証明する (L e v i t a n , D . 等 1 9 9 6 , N a t u r e 3 7 7 : 3 5 1 ; B a u m e i s t e r , R . 等 1 9 9 7 , G e n e s F u n c t i o n 1 : 1 4 9)。

【0007】

s e l - 1 2 は N o t c h 遺伝子 l i n - 1 2 の活性化対立遺伝子のサブレッサーとして遺伝学的に同定された。この発見はプレセニリン活性及び N o t c h シグナル伝達経路の活性の間の機能的な関係を証明した。マウス (H e r r e m a n , A . 等 1 9 9 9 , P N A S 9 6 : 1 1 8 7 2)、ショウジョウバエ (S t r u h l , G . 等 1 9 9 9 , N a t u r e 3 9 8 : 5 2 2 ; Y e , Y . 等 1 9 9 9 N a t u r e 3 9 8 : 5 2 5) 及び線虫 (L i , X . 等 , 1 9 9 7 , P N A S 9 4 : 1 2 2 0 4 ; W e s t l u n d , B . 等 1 9 9 9 , P N A S 9 6 : 2 4 9 7) でのインビボ実験では、プレセニリン活性の完全な欠損の表現型が生物における N o t c h シグナル伝達の完全な排除と非常によく一致することが示され、N o t c h シグナル伝達活性に絶対的に必要であることを示唆する。N o t c h レセプターは、無脊椎動物及び脊椎動物の多くの胚及び成体の

10

20

30

40

50

組織の分化に重要な細胞間シグナル伝達現象を媒介する細胞表面にある1回貫通型の膜貫通タンパク質である。シグナル伝達は、膜貫通セグメントの内面におけるNotchのリガンド依存性切断、それに続く核のC末端ドメインの転位座に参与する。細胞培地及びインビボでのNotchプロセシングの分析は更に、プレセニリンがNotch細胞内ドメインを膜貫通ドメインから放すリガンド依存性切断現象に必要であることを示した(Strohmann, G.等 1999, Nature 398: 522; De Strooper, B.等 1999 Nature 398: 518)。Notch及びAPPの両方の切断におけるプレセニリンの類似した要求は、Notchシグナル伝達経路がプレセニリン系遺伝子のスクリーニングでAb生成の代わりに利用できる代用のアッセイであり得ることを示唆する。

10

【0008】

線虫プレセニリンsel-12及びhop-1の突然変異は、線虫Notchレセプターlin-12及びglp-1による欠陥のあるシグナル伝達と関係した表現型となる。hop-1単独の欠損では、明らかな表現型とはならない。sel-12の欠損は、lin-12突然変異を思わせる産卵口の欠損と強い産卵障害表現型となる。sel-12及びhop-1両方の欠損はsel-12単独の場合に見られるNotch表現型をより重大に生じる。sel-12;hop-1二重突然変異に見られる特定の表現型は、これらの虫が母性の野生型プレセニリン活性を受け継ぐかどうかによる。母性的に与えられるsel-12+活性がある場合、二重突然変異は新たな産卵欠陥表現型を示し、全ての子孫がglp-1様の発達欠陥で胚形成の間に停止する。母性sel-12+活性のない場合には、二重突然変異はglp-1突然変異の生殖系列増殖欠陥特性を有する生殖不能のより強い表現型を示す。総合して、この一連の特性は、sel-12及びhop-1が部分的に重複し、2つの線虫Notchレセプターによるシグナル伝達を刺激するために協調的に作用することを示す。

20

【0009】

sel-12とhop-1活性の間の部分的な重複性は、sel-12;hop-1二重突然変異に相当する表現型を生じうる機能対立遺伝子のsel-12欠損のエンハンサー検索を可能にする。このエンハンサースクリーニングは、pen-1及び2(pen=プレセニリンエンハンサー)と名付けられ、プレセニリン機能に必要とされる2つの新規な遺伝子を同定した。pen遺伝子の表現型に基づいて、我々は第3のプレセニリンエンハンサー遺伝子、aph-2を同定した。pen-1、pen-2及びaph-2遺伝子配列は、pen-1Bを含むヒト及び他の動物のオルソログ遺伝子を同定する。これらの遺伝子及びそれらを調節する方法は、アルツハイマー病治療のための治療法進歩のための対象である。

30

【0010】

(関連分野)

ヒトpen-1に関する配列は、特にWO9855508、WO9855508、WO9906554及びUnigene CGI-78(GI#6911522及びGI#4929623)に見られる。

ヒトpen-2に関する配列は、特にAD000671(ゲノム)及びGI#3601371(cDNA)に見られる。

40

ヒトAph-2に関する配列は、特にWO9845435、WO9845436、WO9300353及び(KIAA0253、DNA GI1665772、タンパク質GI1665773)に見られる。

多数のESTsが、ここに開示される天然ヒトpen-1B配列の部分を含む公的データベースに見られ、ns43g08.sl(GI#2874520、注釈なし)及びUnigeneコンティグHs.42954(pen-1(CGI-78)に53%類似)のESTsを含み、それは、AI538204(IMAGE:2189986); AA808355(IMAGE:1334417); N21153(IMAGE:264868); AI204164(IMAGE:1734840); AI001990(IMAGE

50

: 1619191); AA578718 (IMAGE: 953241); AA887975 (IMAGE: 1160119); AI004282 (IMAGE: 1626004); AI188040 (IMAGE: 1738954); AI192033 (IMAGE: 1738659); AI005113 (IMAGE: 1626277); AW118908 (IMAGE: 2605631); AI760754 (IMAGE: 2398349); AA805770 (IMAGE: 1186430); AA805757 (IMAGE: 1186406); AW182071 (IMAGE: 2662428); AA805773 (IMAGE: 1186436); AI301191 (IMAGE: 1897253); AA976455 (IMAGE: 1589895); 及びN31710 (IMAGE: 271292)。

10

【0011】

(発明の概要)

本発明は、プレセニンエンハンサータンパク質 (pens) に関する方法、組成物及びシステムを提供し、プレセニン - pen相互作用を調節 (例えば、促進又は抑制) 及び検出する方法を含む。特定の態様では、本方法は、上流又は下流のNotch又はAPPのプロセッシングとプレセニンエンハンサー (pen) の機能的相互作用を変化させるストレスを特異的に検出するために提供され、次のことによってなされる: (i) Notch又はAPPプロセッシングとpenの機能的相互作用を提供するシステムに所定のストレスを導入し、それによって、システムはNotch又はAPPプロセッシングとpenのストレス偏向性相互作用を提供し、ストレスのない場合にシステムはNotch又はAPPプロセッシングとpenの不偏性相互作用を提供するものであり; 及び(ii) Notch又はAPPプロセッシングとpenのストレス偏向性相互作用を検出し、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異は、ストレスがNotch又はAPPプロセッシングとpenの相互作用を変化させることを示す。

20

【0012】

システムは、pen発現が非天然又は病原性であると決定されるpenを発現する生細胞、あるいは規定量のpenを含有するインビトロ無細胞混合物であり得る。広範で様々な実施態様が包含され; 例えば、システムが、生細胞、インサイツ又はインビトロであるもの、ストレスが、薬理的に活性な薬剤、或いは例えばpenをコードする別の内在性対立遺伝子のゲノム崩壊又はpenをコードする内在性対立遺伝子の配列アンチセンスを含むポリヌクレオチドの共発現等によるpenの機能的発現の欠損であるものである。或いは、システムは、インビトロ、無細胞混合物であってもよく、ストレスは薬理的に活性な薬剤である。

30

Notch又はAPPプロセッシングとpenのストレス偏向性相互作用は、あらゆる都合のよい手段又はマーカーにより検出することができ、例えばアルツハイマー病の徴候、Notchの転写レポーター、A 等の下流産物の生成又はpenの例えば特定の抗体との構造変化を検出する。

【0013】

本発明は、pen特異的構造及び活性を有するpenポリペプチド、関連するヌクレオチド及びpen機能の調節因子に関する様々な他の方法及び組成物を提供する。penポリペプチドは、対象penポリペプチドコーディング核酸で形質転換した宿主細胞から組み換えにより作成しても、例えば哺乳動物細胞等の天然源から精製してもよい。本発明は、天然pen遺伝子と特異的にハイブリッド形成する能力のある単離したpenハイブリダイゼーションプローブ及びプライマー、penに特異的に結合する薬剤、例えば特異的抗体、アゴニスト及びアンタゴニスト、並びに診断 (例えばpen転写物の遺伝子ハイブリダイゼーションスクリーニング)、治療 (例えば、A 生成を調節するpen阻害物質) 及び生物薬剤産業 (例えば、免疫原、天然pen遺伝子及び転写物を単離するための試薬、リード薬物の化学ライブラリをスクリーニングするための試薬) における対象組成物を製造及び使用する方法を提供する。特定の態様では、pen方法及び組成物はpen-1Bポリペプチドに関する。

40

50

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明は、プレセニンエンハンサータンパク質 (pens) に関する方法、組成物及びシステムを提供し、penとNotch又はAPPプロセッシングとの間の相互作用を調節 (例えば、促進又は阻害) 及び/又は検出の方法を含む。特定の実施態様では、本方法は、プレセニンエンハンサー (pen) とNotch又はAPPプロセッシングの機能的な相互作用を変化させるストレスの特異的な検出を提供する。

penはpen-1、pen-1B、pen-2及びAph-2ポリペプチドから単独で選択される。これらの名称は、開示された親配列を含む、その特定断片を含む、或いは開示される親配列に類似した配列を有するポリペプチドを呼ぶ際に一般的に使用され、配列類似性は、少なくとも40%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは100%であり、具体的に開示されるプレセニン又は相当する親配列pen特異的抗体に特異的に結合し、一以上の開示される相互作用アッセイで測定される。ポリペプチドは、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、より好ましくは少なくとも50の連続した残基、及び最も好ましくは全ポリペプチド及び/又は親pen配列にわたって含み、並びに類似性又は同一性がその範囲にわたる。

【0015】

表1. 親penポリペプチド

| 親pen | 天然源 | 配列番号 | BLASTによる ヒト親penに対する%同一性 |
|--------|-------------------------------|------------|----------------------------|
| pen-1 | 線虫 | (配列番号: 1) | 28.7 |
| | キイロショウジョウバエ | (配列番号: 2) | 45.4 |
| | オオタバコガ(<i>H. virescens</i>) | (配列番号: 3) | 50 |
| | マウス | (配列番号: 4) | 92.8 |
| | ヒト | (配列番号: 5) | 100 |
| pen-1B | ヒト | (配列番号: 6) | 51 (ヒト親pen-1に対する同一性) |
| pen-2 | 線虫 | (配列番号: 7) | 42.6 |
| | キイロショウジョウバエ | (配列番号: 8) | 60.4 |
| | ラット | (配列番号: 9) | 96 |
| | マウス | (配列番号: 10) | 96 |
| | ウシ | (配列番号: 11) | 95 |
| | ヒト | (配列番号: 12) | 100 |
| Aph-2 | 線虫 | (配列番号: 13) | 18.9 |
| | キイロショウジョウバエ | (配列番号: 14) | 29.9 |
| | ヒト | (配列番号: 15) | 100 |

【0016】

開示される同義遺伝子について、親配列に関して「特定のウィンドウサイズWを超えるパーセント (%) 配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならばギャップを導入した後に、親配列の残基と一致する候補配列のW残基の任意のウィンドウにおける残基のパーセンテージとして定義される。%同一性の値は、Altschul等, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html> から得られるWU-BLAST-2.0a19により作られる。幾つかの検索パラメー

タを使用するWU-BLAST-2.0a19は、その全てが初期の値に設定される。HSPSとHSPS2パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成及び対象の配列が検索されるものに対する特定のデータベースの組成に応じてプログラム自身により確立されるが；しかしながら、値は感度を向上させるように調節してもよい。従って、%アミノ酸配列同一性の値は、パーセント同一性が記録されるウィンドウサイズWで割った一致する同一残基数により決定される。一致する親配列を突然変異させ、プレセニン又は抗体結合を確認することにより例示的な種が容易に作成される。例えば、配列番号：16-25に定義されるpen-1Bポリペプチドは、親配列である配列番号：6の周りに活性な（プレセニン結合を示す）90%のジーンズを例証する。特定の実施態様では、penは天然のpen、例えばヒト、マウス、キロショウジョウバエ、オオタバコガ（*H. virescens*）又は線虫のpen-1；ヒト、ラット、マウス、ウシ、キロショウジョウバエ又は線虫のpen-2；ヒトのpen-1B；及びヒト、キロショウジョウバエ又は線虫のAph-2である。特定の態様では、sel-12（は欠失対立遺伝子を意味する）ホモ接合penは線虫遺伝子突然変異エンハンサースクリーニングで同定可能な天然に生じるpenである。

10

20

30

40

50

【0017】

penとNotch又はAPPプロセッシングとの間の相互作用は、プロセッシング経路でのpenの影響を特異的にアッセイするあらゆる便利な方法で検出されうる。生成物の生成（例えば、A又はNotch細胞内ドメイン生成）の下流摂動、中間経路段階（多くの中間Notch及びAPPプロセッシング経路段階及び中間成分相互作用が当該分野でよく記録されてる）、又はpen-プレセニン又はpen-分泌酵素結合の開始をモニターするためにアッセイが構築されうる。

広範な種々のシステムが本方法に使用されうる。以下に記載されるのは、突然変異体pen遺伝子でストレスを与え、感作したNotch及び/又はAPPプロセッシング経路を提供する動物システムであり、システムは更なる相互作用タンパク質を特徴づけるのに使用される。特定の実施態様では、システムはプレセニン又は分泌酵素等の結合標的とpenの両方を発現する細胞又は動物、規定量のpen及び結合標的を含有するインビトロ無細胞混合物を含み；このような細胞及び混合物の適用は、2-ハイブリッド、生化学的pull-down、免疫沈降、蛍光偏光及び固相結合アッセイを含む。適用できるシステムの多様性により、化学薬品、例えば候補薬、毒、汚染物質等；放射線、例えば紫外線及びx線；感染、例えば細胞性形質転換を含むウイルス又は細菌感染；遺伝子突然変異等を含む広範な種々のストレスがアッセイ又は評価されうる。

【0018】

相互作用が特異的に検出されれば、penポリペプチドとプレセニンの相互作用の検出のために用いられる特定の方法はアッセイの性質に依存しうる。例えば、以下に説明されるように、pen突然変異体特定表現型の調節は、遺伝子相互作用アッセイについての読み取りを与える。インビトロアッセイにおいて、penポリペプチド及び/又は標的が標識されるかどうか、どのようにしてそれが為されるかによって、相互作用の読み取りは蛍光、光学濃度、ゲルシフト、放射等の変化により測定されうる。特定の実施態様では、システムは下流APPプロセッシング読み取りを提供する。

特定の実施態様では、本方法は、APP及び/又はNotchプロセッシングとpenポリペプチドの物理的な相互作用を変化させるストレスの特異的な検出を包含する。一態様では、この実施態様は次の工程を含む（a）結合標的とpenの物理的相互作用を与えるシステムに所定のストレスを導入する工程、それによりシステムが標的とpenのストレス偏向性相互作用を提供し、ストレスのない場合にシステムは標的とpenポリペプチドの不偏性相互作用を提供する；及び（b）標的とpenポリペプチドのストレス偏向性相互作用を検出する工程、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異によって、ストレスが標的とpenポリペプチドの相互作用を変化させることを示し、好ましい標的は分泌酵素、プレセニン、notch及び/又はAPP基質、及び/又はその組み合わせ及び複合体を含む。

【0019】

後者の実施態様では、プレセニリンはプレセニリン - 1 (P S - 1) 及びプレセニリン - 2 (P S - 2) から選択される。これらの名称は、一般に開示される親配列を含む、又はその特定断片を含む、又は開示された親プレセニリン配列に対して配列類似性を有するポリペプチドを称するのに使用され、配列類似性は少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%及び最も好ましくは100%であり、ここでプレセニリンは、一以上の開示される遺伝子的又は生化学的相互作用アッセイで測定されるような相当親配列プレセニリンにより提供されるものと比較して、プレセニリンに特異的で検出可能な機能的相互作用を提供するのに十分である。プレセニリンは、少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、より好ましくは少なくとも50の連続した残基、最も好ましくは全長プレセニリン又は親配列を含み、類似性又は同一性がその範囲にわたる。親プレセニリンは、当該分野でよく知られ Genbank 等の公的な受託者から入手できる、天然配列プレセニリン1 (例えば、ヒト、マウス、ニワトリ及びアフリカツメガエルの配列) 及びプレセニリン2 (例えば、ヒト、マウス、及びアフリカツメガエルの配列) から選択される。

10

【0020】

対象とする方法に有用な本発明の組成物は、対象とする pen ポリペプチド及び所定量の開示される pen 及びプレセニリンポリペプチドを含む混合物を含み、特に、好ましくはこれらの成分が共に単離されるもの及び本質的に両成分からなる混合物、即ち、混合物の他の成分 (アッセイしたストレスを除く) がこれら2つの成分の相互作用に有意に影響しないものである。本発明の他の態様は、開示される pen ポリペプチドをコードする核酸、それらに特異的に結合する抗体、及び使用方法を含む。

20

開示される親配列又はその断片からなる対象ポリペプチドが単離され、即ち非天然又は異種性の成分、例えば非天然アミノ酸又はアミノ酸配列或いは天然のタンパク質においてポリペプチドが結合するもの以外の天然アミノ酸又は配列と共有的に結合する pen ポリペプチドを包含し、好ましくは溶液中にあり、好ましくは得られる試料中で全ポリペプチドの少なくとも約0.5重量%、より好ましくは少なくとも約5重量%を構成し、純粋なポリペプチドが、得られる試料中で全ポリペプチドの少なくとも約90重量%、好ましくは少なくとも約99重量%を構成し、親配列以外を含む対象ポリペプチドが好ましい。ポリペプチドはより大きい複合体、例えばより大きいポリペプチド及び/又は種々のコンジュゲート等の共有的又は非共有的な部分でありうる。ポリペプチドは組み換え技術により合成、作成され、又は哺乳動物、好ましくはヒト細胞から精製されうる。広範な種々の分子及び生物化学の方法が生化学合成、分子発現及び対象とする組成物の精製に利用可能であり、例えば Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, 等 Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, 等, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) 又は他に当該分野で既知のものを参照のこと。

30

【0021】

断片を包含する pen は、相当する開示した親 pen 配列の少なくとも10、好ましくは少なくとも15、より好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも35、最も好ましくは少なくとも50の連続する残基を含む。pen ポリペプチドは、相当する pen 特異的機能、例えば天然 notch 又は APP プロセッシング過程、特にここで開示されるような一以上の結合アッセイに示されるようなプレセニリン結合又は結合阻害活性、及び/又は特に開示される結合アッセイで測定されるような pen 特異的抗体結合又は結合阻害活性との相互作用を提供する。

40

pen 特異的機能は、便宜的なインビトロ、細胞系、又はインビボアッセイ、例えば結合アッセイにより測定することができる。結合アッセイという用語は、一般に pen ポリペプチドと特異的結合標的の分子相互作用を評価する、インビトロ、細胞培地又は動物系ア

50

ッセイ（例えば遺伝子治療技術を使用する又は遺伝子組み換えを含む）等を含むあらゆるアッセイを包含して使用される。結合標的は、天然細胞内結合標的、例えばプレセニン、pen調節タンパク質又はpen活性もしくはその局在を直接変化させる他の調節分子；あるいは非天然結合標的、例えば下記されるようなスクリーニングアッセイで同定されるもののようなpen特異的薬剤、又は抗体等の特異的免疫タンパク質であり得る。pen結合特異性は、APPプロセッシング（例えば、pen発現細胞の負のエフェクターとしての機能に対する対象ポリペプチドの能力）により、結合平衡定数（通常は少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約 $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^9 M^{-1}$ ）により、免疫原性（例えば、マウス、ラット、ヤギ又はウサギ等の異種の宿主のpen特異的抗体を誘発する能力）等によりアッセイされ得る。

10

【0022】

特定の実施態様では、対象ポリペプチドは、特に担体タンパク質と結合する場合にpen特異的抗原及び/又は免疫原を提供する。例えば、対象ポリペプチドはキーホールリンペット抗原（KLH）に共有的に結合し、コンジュゲートは完全フロイントアジュバンドに乳化される。実験用ウサギを従来のプロトコールに従って免疫化し、出血させる。pen特異的抗体の存在を、免疫化した対応するpenポリペプチドを用いて固相免疫吸着アッセイによりアッセイする。例えば表2参照。

表2. pen-1B特異的ウサギポリクローナル抗体を誘発する免疫原pen-1Bポリペプチド：上記されるプロトコールにより免疫化されたpen-1Bポリペプチド-KLHコンジュゲート

20

| <u>pen-1B</u> ポリペプチド配列 | 免疫 原性 | <u>pen-1B</u> ポリペプチド配列 | 免疫 原性 |
|---------------------------|----------|---------------------------|----------|
| 配列番号：6、残基1-14 | +++ | 配列番号：6、残基115-126 | +++ |
| 配列番号：6、残基6-15 | +++ | 配列番号：6、残基130-140 | +++ |
| 配列番号：6、残基10-20 | +++ | 配列番号：6、残基139-151 | +++ |
| 配列番号：6、残基25-46 | +++ | 配列番号：6、残基166-182 | +++ |
| 配列番号：6、残基62-71 | +++ | 配列番号：6、残基184-198 | +++ |
| 配列番号：6、残基67-76 | +++ | 配列番号：6、残基214-232 | +++ |
| 配列番号：6、残基72-95 | +++ | 配列番号：6、残基246-257 | +++ |

30

【0023】

対象penポリペプチドはまた、N-及び/又はC-末端切断を含む、親penポリペプチドの小さな欠失型突然変異を包含する。このような欠失型の突然変異は、pen競合的又はドミナントネガティブな活性を求めてスクリーニングされる。pen-1Bの例示的な活性欠失突然変異は、配列番号6、残基1-254；配列番号：6、残基4-255；配列番号：6、残基9-257；及び配列番号：6、残基2-255からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

本発明は、天然細胞内結合標的等を含む、請求したpen-1Bポリペプチドに特異的な結合物質、このような物質を同定及び作成する方法、並びに診断、治療及び医薬開発におけるそれらの使用を提供する。例えば、特異的結合物質は、様々な診断及び治療で、特に疾患又は疾患の兆候が例えばAPPプロセッシング等のpenに関わる過程の不適化利用に関係する場合に利用される。新規なpen特異的結合物質は、pen特異的レセプター、例えば体細胞性組み換えポリペプチドレセプター様特異抗体又はT細胞抗原レセプター（例えば、Harlow及びLane（1988）Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory）及び1-、2重-及び3重-ハイブリッドスクリーニング等のアッセイで同定される他の天然細胞内結合物質、ここに記載されるインビトロ、細胞系及び動物系結合アッセイ等の化学ライブラリのスクリーニングで同定される非天然細胞内結合物質、あるいは当

40

50

業者に既知の他のものを含む。特に対象とする物質は pen 機能、例えば、pen 依存性 Notch 又は APP プロセッシングを調節し、ドミナントネガティブな欠失突然変異等を含む。従って、本発明はまた、例えば、常在 pen、ドミナントネガティブ pen 欠失突然変異体、又は pen ポリヌクレオチド（下記）の調節物質と細胞の接触によって、pen 活性の調節段階を含む細胞の APP プロセッシングを調節する方法を提供する。

【0024】

また、直接的な合成に加えて、対象のポリペプチドは対応する親ポリヌクレオチド、又は縮重オリゴヌクレオチドプライマー及び対象のポリペプチド配列から創出された（“GC G”ソフトウェア、Genetics Computer Group, Inc, Madison WI）プローブを用いて単離された天然コード化ポリヌクレオチド、又はコンピュータアルゴリズムに従って対象のポリペプチドを逆翻訳（back-translation）することにより作成される選択された発現系に最適化されたポリヌクレオチド（例えば、Holler 等（1993）Gene 136, 323-328; Martin 等（1995）Gene 154, 150-166）などのコード化ポリヌクレオチドから細胞及び無細胞系で発現させることもできる（例えば、Jermutus L, 等, Curr Opin Biotechnol, 1998 Oct; 9(5): 534-48）。従って、ポリペプチドは組み換え技術により合成、作成され、或いは細胞から精製されうる。広範な種々の分子及び生物化学の方法が生化学合成、分子発現及び対象組成物の精製に利用可能である。例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrock, 等 Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, 等, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) 又は他に当分野で既知のものを参照のこと。

【0025】

本発明は、開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び pen 遺伝子特異的ポリヌクレオチドを提供し、該ポリヌクレオチドは他の化合物、例えば標識又は他のポリヌクレオチド配列と結合されていてもよく（即ち、それらはより大きい配列の部分であってもよい）、合成/非天然配列のものであり、及び/又は単離され、即ちその天然状態に関わる少なくとも幾つかの物質を伴わず、好ましくは得られる分画に存在する全核酸の少なくとも約 0.5 重量%、より好ましくは約 5 重量%を構成し、通常、組み換え体は、それらが天然染色体で結合するもの以外のヌクレオチドと結合した非天然配列又は天然配列を含むことを意味する。天然配列を含む組み換えポリヌクレオチドは、末端にこのような配列を含み、天然染色体で結合するもの以外の配列に直接隣接し（即ち連続する）、あるいは 10 kb 未満、好ましくは 2 kb 未満、より好ましくは 500 塩基未満、最も好ましくは 100 塩基未満の天然隣接領域に隣接し、それは末端にあるか、又は天然染色体で結合するもの以外の配列に直接隣接する。ポリヌクレオチドは、通常 RNA 又は DNA であるため、しばしば他の塩基又はヌクレオチド類似体を含むポリヌクレオチドを使用して変化した安定性等を得るのに有利である。更に、ポリヌクレオチド及び核酸という用語は、長さの制限なく、ヌクレオチドのあらゆる重合体を指して互換的に使用される。

【0026】

本発明はまた、pen、特に pen-1B 遺伝子特異的ポリヌクレオチドを包含する。例えば、天然ヒト pen-1B ポリペプチドをコードする天然ヒト転写物のヌクレオチド配列は、配列番号：26 として示される。pen-1B 遺伝子特異的ポリヌクレオチドは、通常、配列番号：26 を含む、配列番号：26 の特定断片を含む、あるいは配列番号：26 と配列類似性を有するポリヌクレオチドを指して使用され、例えばハイブリダーゼーションプローブ及び複製/増幅プライマーとして利用でき、配列番号：26 の少なくとも 12、好ましくは少なくとも 24、より好ましくは少なくとも 48、より好ましくは少なくとも 96 及び最も好ましくは少なくとも 182 の連続したヌクレオチドを含む。

pen 遺伝子特異的ポリヌクレオチドは、相当する親配列又はその補体との特異的ハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーションに影響を与え；例えば、全ての pen - 1 B 遺伝子特異的ポリヌクレオチドは、配列番号：26 又はその補体との特異的ハイブリダイゼーションに影響する。示される特異的ハイブリダイゼーションは、通常のスリンジェンシー条件、例えば 30% のホルムアミド含有 5 x S S P E (0 . 1 8 M の NaCl、0 . 0 1 M の NaPO₄、pH 7 . 7、0 . 0 0 1 M の EDTA) バッファーを含む緩衝液で 42 の温度でのハイブリッド形成、及び 42 の 0 . 2 x S S P E を用いて 42 で洗浄したときに結合して残留し；好ましくは 50% のホルムアミド含有 5 x S S P E バッファーを含む緩衝液で 42 の温度でのハイブリッド形成、及び 42 の 0 . 2 x S S P E バッファーを用いて 42 で洗浄したときに結合して残留することを必要とする。特異的にハイブリッド形成したポリヌクレオチドは、簡便なゲルベース (gel - based) アッセイで簡単に同定され；例えば、配列番号 27 - 38 を含むポリヌクレオチドは、上述の好ましいハイブリダイゼーション条件下で配列番号：26 と特異的にハイブリッド形成することが示される。

10

【 0 0 2 7 】

表 3 . 条件 I 及び II で配列番号：26 の鎖とハイブリッド形成する例示的な pen - 1 B 遺伝子特異的ポリヌクレオチド

| <u>pen-1B 遺伝子特異的 ポリヌクレオチド</u> | <u>特異的 ハイブリッド</u> | <u>pen-1B 遺伝子特異的 ポリヌクレオチド</u> | <u>特異的 ハイブリッド</u> |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 配列番号：26、残基 1-36 | + | 配列番号：27 | + |
| 配列番号：26、残基 32-68 | + | 配列番号：28 | + |
| 配列番号：26、残基 65-97 | + | 配列番号：28 | + |
| 配列番号：26、残基 103-140 | + | 配列番号：30 | + |
| 配列番号：26、残基 131-154 | + | 配列番号：31 | + |
| 配列番号：26、残基 148-182 | + | 配列番号：32 | + |
| 配列番号：26、残基 222-256 | + | 配列番号：33 | + |
| 配列番号：26、残基 258-286 | + | 配列番号：34 | + |
| 配列番号：26、残基 273-305 | + | 配列番号：35 | + |
| 配列番号：26、残基 318-352 | + | 配列番号：36 | + |
| 配列番号：26、残基 344-376 | + | 配列番号：37 | + |
| 配列番号：26、残基 352-386 | + | 配列番号：38 | + |
| 配列番号：26、残基 388-424 | + | | |
| 配列番号：26、残基 406-431 | + | | |
| 配列番号：26、残基 420-446 | + | | |

20

30

【 0 0 2 8 】

対象核酸は、翻訳可能な転写物、ハイブリダイゼーションプローブ、PCR プライマー、診断用核酸等としての使用；他の pen 遺伝子特異的ポリヌクレオチド及び遺伝子転写物の存在の検出において並びに更なる pen 相同体及び構造類似体をコードする核酸の検出又は増幅においての使用を含む広範な種々の用途が見出される。例えば、pen コーディングポリヌクレオチドは pen 発現ベクターで使用することができ、一般に異種プロモーターに作用可能に結合し、及び / 又は例えば、発現及びスクリーニングのために、組み換え宿主細胞に、例えば pen 調節細胞機能に関する疾患の候補薬の効果等の機能研究のために、形質転換動物に組み込まれる。診断では、pen ハイブリダイゼーションプローブは、臨床及び研究用試料での野生型及び突然変異 pen 対立遺伝子の同定における使用が見出される。突然変異対立遺伝子は、例えばアルツハイマー病に関する pen 突然変異のためなどの、高処理臨床診断のための対立遺伝子特異的プローブを作成するのに使用される。治療では、治療用 pen ポリヌクレオチドは、活性 pen の細胞発現又は細胞内の濃度あるいは有効性を調節するために使用する。

40

50

【0029】

例えば、penポリヌクレオチドは、活性penタンパク質の細胞発現又は細胞内濃度或いは有効性を調節するために使用される。penの抑制性核酸は、典型的にはアンチセンス：開示される天然pen転写配列の補体を含む1本鎖配列である。得られるpenポリペプチドの発現のアンチセンス調節には、遺伝子調節配列に作用可能に結合するアンチセンス核酸を用いることができる。遺伝子の転写が内在性penコーディングmRNAへの結合能力のあるアンチセンス転写物を生産するように適応させたプロモーター配列を有するpen遺伝子特異的ポリヌクレオチドを含むベクターで細胞に形質移入する。或いは、ゲノムDNA又はmRNAコーディングpenポリペプチドに結合する1本鎖アンチセンスポリヌクレオチドは、標的タンパク質の発現の実質的な減少を生じる濃度で、宿主内の又は宿主から一時的に単離された標的細胞に投入されうる。pen発現の増強は、相当する遺伝子産物の機能発現を増大させるpenポリヌクレオチドを標的とする細胞型に導入することにより成される。このようなポリヌクレオチドはpen発現ベクター、内在性対立遺伝子の機能発現を促進制御するベクター、あるいは内在性突然変異又は野生型対立遺伝子の対象とする修飾の置換ベクターであり得る。核酸を生細胞に導入するための技術は当分野で既知であり、レトロウィルス系トランスフェクション、ウィルスコートタンパク質-リボソーム媒介トランスフェクション等を含む。

10

【0030】

本発明は、転写を含む細胞性機能及び/又はpen遺伝子発現の調節が可能なpenのレベルで活性な薬剤、化合物又は薬剤のリード化合物を同定する効果的な方法を提供する。標識したインビトロリガンド結合アッセイ、免疫アッセイ等を含む転写調節物質又は結合物質のための広範で種々のアッセイを提供する。方法は、リード化合物の化学ライブラリの自動化した対費用効率のよい高処理スクリーニングに従う。同定される試薬は、動物及びヒトの治験のための医薬産業での使用が見出され；例えば、試薬は医薬の開発のための活性の最適化及び毒性の最小化のためのインビトロ及びインビボアッセイで誘導体化され、再スクリーニングされうる。

20

結合物質の広範で種々のアッセイ、例えば天然pen結合標的とのpen相互作用を調節する化合物のスクリーニングもまた提供される。これらのアッセイは、例えば検出又は固着のためのペプチドタグ等の他のポリペプチドとの融合産物の部分であり得るpenポリペプチドを含む成分の混合物を用いる。アッセイ混合物は、天然細胞内pen結合標的を含む。特定の実施態様では、結合標的はプレセニリン、或いはそのアッセイで簡便に測定可能な対象penポリペプチドに対する結合親和性及び結合活性を好ましくは無償のプレセニリンに匹敵する程度で与える部分である。アッセイ混合物はまた、候補薬物を含む。候補薬は多くの化学分類を包含するが、典型的にそれらは有機化合物；好ましくは小有機化合物であり、合成又は天然化合物のライブラリを含む広範で種々の供給源から得られる。また、様々な他の試薬が混合物中に含まれうる。これらは、塩、緩衝液、中性タンパク質、例えばアルブミン、界面活性剤、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等を含む。

30

【0031】

できた混合物は、仮に候補薬物が存在しなければpenポリペプチドが細胞性結合標的、部分又は関連した結合親和性を有する類似物に特異的に結合するような条件下でインキュベートされる。混合物の成分は、必要な結合を提供する任意の順序で添加することができる。インキュベーションは最適な結合を促進する任意の温度で実施することができる。インキュベーション時間は同様に、最適な結合について選択されるが、高速の、高処理スクリーニングを促進するために最小化される。

40

インキュベーションの後、penポリペプチドと一以上の結合標的の間の薬剤系結合が、任意の都合のよい方法によって検出される。産物の性質及び他のアッセイ要因に依存する、例えば光学又は電子密度、放射性放出、無放射性エネルギー移動等、あるいは抗体コンジュゲート等を用いた間接的検出による変化を検出するために様々な方法が使用されうる。薬剤存在下での結合親和性に比較した、薬剤不存在下での標的に対するpen-1Bの

50

結合親和性の差異は、薬剤が pen 結合標的に対する pen の結合を調節することを示す。ここで使われる差異は、統計的に有意であり、好ましくは少なくとも 50%、より好ましくは少なくとも 90% の差異を示す。

次の実験の部分及び実施例は、例示のために提供され、限定するものではない。

【0032】

実施例、プロトコール及び実験方法

I . 高処理インビトロ蛍光偏光アッセイ

試薬：

pen ペプチド (サイズ最小化、ローダミン標識；最終濃度 = 1 - 5 nM)

PS ポリペプチド (最終濃度 = 100 - 200 nM)

緩衝液：10 mM の HEPES、10 mM の NaCl、6 mM の塩化マグネシウム、pH 7.6

プロトコール：

1 . 90 マイクロリットルの pen ペプチド / PS ポリペプチド混合物を 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに加える。

2 . ウェルにつき 10 マイクロリットルの試験化合物を加える。

3 . 5 分振盪し、Fluorolite FPM - 2 Fluorescence Polarization Microtiter System (Dynatech Laboratories 社) を用いて蛍光偏光の量を 5 分以内に測定する。

【0033】

II . 高次構造センサー - ELISA フォーマットアッセイ

緩衝液及び溶液の調製：

1 . 10 X アッセイ緩衝液：

1 M の HEPES を 100 mL

5 M の NaCl を 300 mL

1 M の MgCl を 20 mL

MQ H₂O を 1 L まで加える

2 . ペプチド / タンパク質のマスターミックス

タンパク質：グルタチオン S トラंसフェラーゼ / 分泌酵素ポリペプチド融合タンパク

質：最終濃度 = 100 nM

pen ペプチド (サイズ最小化、ビオチン標識；最終濃度 = 1 μM)

アッセイ緩衝液及び H₂O を最終容量になるまで加える：最終緩衝液濃度 = 1 X

3 . 抗体の構成：

抗 GST、ウサギ (最終濃度 = 1 : 10000)

抗ウサギ HRP (最終濃度 = 1 : 10000)

T - TBS を最終容量になるまで加える：最終緩衝液濃度 = 1 X

【0034】

方法：

1 . 適切なペプチド / タンパク質の組み合わせの 50 mL のマスターミックス (上記 2 参照) を生成する。RT で 1 時間インキュベートする。

2 . Pierce 社の Super - Blocking 試薬で阻害した、96 穴プレート Reacti - Bind ストレプトアビジン被覆、ホワイトポリスチレンプレート (# 15118B) の各ウェルに 95 μL のマスターミックスを加える。

3 . 5 μL のそれぞれの試験化合物 (ストック = 60 μM) をプレートの各ウェルに移す。

4 . RT で 1 時間プレートをインキュベートする。

5 . インキュベートの間に、抗 GST 抗体と抗ウサギ HRP 抗体の混合物 (上記 3 参照) を生成する。氷上で 1 時間インキュベートする。

6 . プレートを H₂O で 3 回十分に洗浄する。

7 . 100 μL の抗体混合物をプレートの各ウェルに加える。

8. RTで1時間インキュベートする。

9. H₂Oで3回洗浄する。

10. Supersignal 基質 (ルミノール及び過酸化物を混合) を H₂O に 1 : 2 で希釈し、次いで各ウェルに 100 μ L 加える。

11. 3 - 5 分攪拌する。化学発光を読み取る。

【0035】

III. 高処理インビトロ結合アッセイ

A. 試薬:

- 中性のアビジン: PBS 中 20 μ g / ml

- 阻害緩衝液: PBS 中 5% の BSA、0.5% の Tween; 室温で1時間

- アッセイ緩衝液: 100 mM の KCl、20 mM の HEPES pH 7.6、1 mM の MgCl₂、1% のグリセロール、0.5% の NP-40、50 mM の β -メルカプトエタノール、1 mg / ml の BSA、プロテアーゼ阻害剤の混合物。

- ³³P pen ペプチド 10x ストック: 200, 000 - 250, 000 cpm の標識した pen ペプチド (Beckman counter) を補足した 10⁻⁸ - 10⁻⁶ M の「非放射性」pen ペプチド。スクリーニングの間、4 のマイクロフリッジにおく。

- プロテアーゼ阻害剤混合物 (1000X): 10 mg のトリプシン阻害剤 (BMB # 109894)、10 mg のアプロチニン (BMB # 236624)、25 mg のベンズアミジン (Sigma # B-6506)、25 mg ロイペプチン (BMB # 1017128)、10 mg の APMSF (BMB # 917575)、及び 10 ml の PBS 中 2 mM の NaVO₃ (シグマ # S-6508)。

- 結合ポリペプチド: PBS 中 10⁻⁷ - 10⁻⁵ M のビオチン化 PS ポリペプチド。

B. アッセイプレートの調製:

- ウェルにつき 120 μ l のストック N-アビジンで一晩、4 でコートする。

- 200 μ l の PBS で 2 回洗浄する。

- 150 μ l のブロッキングバッファーでブロックする。

- 200 μ l の PBS で 2 回洗浄する。

【0036】

C. アッセイ

- 40 μ l アッセイ緩衝液 / ウェルで添加する。

- 10 μ l の化合物又は抽出物を添加する。

- 10 μ l の ³³P-pen ペプチド (20 - 25, 000 cpm / 0.1 - 10 pmol es / ウェル = 10⁻⁹ - 10⁻⁷ M の最終濃度) を添加する。

- 25 で 15 分間攪拌する。

- さらに 25 で 45 分間インキュベートする。

- 40 μ M のビオチン化 PS ポリペプチド (アッセイ緩衝液中 0.1 - 10 pmol es / 40 μ l) を添加する。

- 室温で 1 時間インキュベートする。

- 200 μ M の PBS で 4 回洗浄して反応を停止する。

- 150 μ M のシンチレーションカクテルを添加する。

- トップカウントで計測する。

D. 全てのアッセイのコントロール (各プレートに配置する):

a. 非特異的結合

b. 80% 阻害での溶解 (非ビオチン化 PS ポリペプチド)

【0037】

IV. プレセニリンエンハンサー遺伝子の同定: 天然 pen-1 及び pen-2 sel

- 12 及び hop-1 の一部重複性は、ほとんどの組織において、どちらか一方の遺伝子の欠失がプレセニリン機能の一部の損失のみを生じることを意味する。従って、どちらか一方の遺伝子におけるノックアウト突然変異はプレセニリン相互作用遺伝子を同定するた

10

20

30

40

50

めに設計される遺伝子スクリーニングに感作された環境を提供する。この推論を用いて、我々はプレセニンと協力して作用する遺伝子の同定の目的で幾つかの種類 of 遺伝子を作成した。1つの種類(選別A)は *sel-12* 欠失突然変異にとってホモ接合である虫を突然変異誘発させ(以下 *sel-12* と称する)、*sel-12* と組み合わせて *sel-12* ; *hop-1* 二重突然変異のものに相当する表現型を作成しエンハンサー突然変異のスクリーニングをする。このようなエンハンサー突然変異を、1) *hop-1* プレセニンと唯一相互作用する成分及び2) *hop-1* 及び *sel-12* プレセニンの両方と相互作用する成分を共に同定する。内在性のコントロールとして、選別が *sel-12* ; *hop-1* 二重突然変異で見られる表現型を対象とするので、選別Aは機能喪失 *hop-1* 対立遺伝子を生成することが期待される。他の差異は、*hop-1* 単一突然変異の突然変異誘発及びさらに完全なプレセニンに伴う表現型の増大についてのスクリーニングをする。

10

【0038】

プレセニンの不足を増大させる所望の突然変異に加えて、これらの選別は、これらの遺伝子産物の欠損が *glp-1* 様の生殖不能を生じるので、*glp-1* シグナル伝達経路の既知の要素における突然変異(例えば、*glp-1* / *Notch* レセプター、*lag-2* / *DSL* リガンド、*lag-2* / *Su(H)* ファミリーエフェクター)を同定する。プレセニンエンハンサーと既知の *glp-1* 系の遺伝子における突然変異との間の重要な差異は、前者が *sel-12* を背景としてのみ *glp-1* 様生殖不能を生じるが、後者は野生型遺伝子の背景(*Austin, J.* 及び *Kimble, J., Cell* (1987) 51:589-599; *Lambie, E.* 及び *Kimble, J., Development* 1991) 112:231-240)と *sel-12* の背景を併せもつ *glp-1* 生殖不能を生じることである。

20

我々は、エチルメタンスルホン酸を用いた *sel-12* ホモ接合株の突然変異誘発の後に約128,000の半数体ゲノムをスクリーニングして選別Aを手広く実施した。選別は、27の推定上の *glp-1* 対立遺伝子、地図の位置に基づいておそらく *lag-1* 又は *lag-2* 対立遺伝子として同定される3の突然変異、及び8の *hop-1* 突然変異を含む期待される型の単離を生じた。期待されるように、推定上の *glp-1*、*lag-1*、及び *lag-2* 突然変異は、野生型及び *sel-12* 遺伝子の両方を背景とした *glp-1* 様生殖不能を生じ; 従って、これらの突然変異は *sel-12* + 機能の存在又は不

30

【0039】

前述に加えて、我々は、マッピング及び相補性試験に基づき、2つの新規なプレセニン相互作用遺伝子を同定する7つの突然変異体を単離した。これらの突然変異体の4つは、染色体Iに位置する遺伝子 *pen-1* を同定し、他の3つは、染色体IIIに位置する遺伝子 *pen-2* を同定する。これらの遺伝子を用いた我々のその後の研究で: 1) *pen-1* 及び *pen-2* エンハンサー対立遺伝子は機能喪失突然変異であり; 2) *sel-12* + 機能の喪失を伴う *pen-1* + 又は *pen-2* + 機能の喪失が、プレセニン機能の完全な喪失として同一の表現型の結果を有し; 3) *sel-12* + を背景とした *pen-1* + 及び *pen-2* + の喪失は、プレセニン/*Notch* 系の機能の一部の喪失を示す表現型を生じ; 4) *pen-1* 及び *pen-2* は *sel-12* 及び *hop-1* の両方と遺伝学的に相互作用し; 5) *pen-1* 及び *pen-2* のオープンリーディングフレームは、無関係の完全な膜タンパク質をコードし; 6) *pen-1* 及び *pen-2* 関連遺伝子は門の分類をこえて保存されていることが示された。

40

【0040】

pen-1 及び *pen-2* 突然変異は、*sel-12* をプレセニン喪失の全体に関わる *lin-12* / *glp-1* 様表現系まで増強させる。*sel-12* 突然変異との二重突然変異として、*pen-1* 対立遺伝子及び *pen-2* 対立遺伝子はそれぞれ、母性 *sel-12* + 活性を受けていない *sel-12* ; *hop-1* の虫に見られるものと同一

50

の表現型の集合を生じる。特に、*sel-12* とのこれらの各二重突然変異は、*sel-12* 又は *hop-1* 単一突然変異、あるいは *pen-1* 又は *pen-2* 単一突然変異には見られない3つの共通の異常を共有する。第1に、二重突然変異の3つ全ての集合は、*glp-1* 機能消失突然変異について記載されたもの (*Austin* 及び *Kimble*, 1987) と同様の生殖細胞増殖により特徴付けられる区別のつかない *glp-1* 様生殖不能表現型を示す。第2に、3つ全ての二重突然変異は *lin-12/Notch* シグナル伝達の欠損を示す共通の細胞運命特性を示す。*lin-12* + 活性は、アンカー細胞運命の決定に対して腹側の子宮前駆体に必要であり：*lin-12(lf)* 突然変異は、正常に腹側子宮前駆体運命をとる細胞が代わりにアンカー細胞になるので、その正常な補体ではなく、2つのアンカー細胞を有する (*Greenwald*, I. 等, *Cell* (1983) 34:435-444)。 *sel-12* ; *pen-1* 及び *sel-12* ; *pen-2* 二重突然変異は、 *sel-12* ; *hop-1* 二重突然変異がそうであるように、この「2つのアンカー細胞」表現型を示す (*Westlund*, B 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96:2497-2502)。第3に、 *sel-12* ; *pen-1* 及び *sel-12* ; *pen-2* 二重突然変異は、 *sel-12* ; *hop-1* のように、 *lin-12(lf)* 突然変異に見られる産卵口の欠陥を思わせるめくれた産卵口の表現型を示す。

10

【0041】

前記の表現型の比較は、*pen-1* + 又は *pen-2* + 活性の減少が、 *sel-12* + 活性の欠損と併せて、 *sel-12* 及び *hop-1* によりコードされる2つの重複したプレセニリンを排除する効果に匹敵するプレセニリン系機能の喪失を生じる。単一の *pen-1* 及び *pen-2* 突然変異は、プレセニリン機能の部分的な喪失に関する表現型を与える。単一の突然変異のように、 *pen-1* 及び *pen-2* の虫は2つの明らかな異常を示す。第1に、 *pen-1* 及び *pen-2* ホモ接合体 (*pen-1/+* 又は *pen-2/+* の雌から産まれた) は共に、正常な数の自己子孫の胚を作るが、これらの胚は動物の子宮にとどまり、産まれることはない。従って、 *pen-1* 及び *pen-2* 雌雄同体は産卵欠陥 (又は *Egl*) があり、表現型は *sel-12* 単一突然変異と共通していた。

20

【0042】

第2に、ホモ接合 *pen-1* 又は *pen-2* 雌雄同体から産まれた胚は孵化しないが、代わりに複数の異常のある発達を停止する。 *pen-1* 及び *pen-2* 雌雄同体から産まれた停止した胚は、非常に類似した異常を見せる。最も著しくは、多くの停止した胚が部分的な咽頭のみを生じ；後部咽頭葉はあるが、前葉はない。前咽頭の欠如は、(前咽頭がないことに関する) *Aph* 表現型と呼ばれ、最初 *glp-1* の特定の劣勢対立遺伝子として説明された。 *GLP-1* レセプターは前咽頭の形成を誘発する特定のシグナル伝達の現象に必要であり (*Mello*, C. 等, *Cell* (1994) 77:95-106; *Moscovitz*, I 等, *Development* (1994) 120:3325-3338; *Hutter*, H. 及び *Schnabel*, R., *Development* (1994) 120:2051-2064); 従って、母性付与型の *glp-1* + 活性の欠如は、 *Aph* 表現型並びに他の欠損を生じる (*Priess*, J. 等., *Cell* (1987) 5:601-611)。減少したプレセニリン機能と *Aph* 表現型の関連は、母性 *sel-12* + を受ける *sel-12* ; *hop-1* 雌雄同体の分析 (母性 *sel-12* + 機能の欠如に見られる生殖不能をレスキューすること) によってもたらされる。この状況において、 *sel-12* ; *hop-1* 雌雄同体は、他の *glp-1* 様の胚欠陥に加えて、同様に *Aph* 表現型を表す停止した胚を産む (上掲の *Westlund*, B.)。 *pen-1* 及び *pen-2* のこれらの特性は、 *pen-1* 又は *pen-2* の欠損が *sel-12* 又は *hop-1* 単一突然変異によって引き起こされるものよりも深刻な表現型を引き起こすので、両方の遺伝子が *sel-12* 及び *hop-1* の両方のプレセニリンと協力して作用することを示す。

30

40

【0043】

50

Aph表現型に加えて、ホモ接合pen-1又はpen-2雌雄同体により生成される胚は他の異常を表す。通常、胚はほとんど伸長の形跡なしに停止し、胚の皮下組織(角質の下及び裏にある表皮細胞の層)はしばしば他の細胞型を完全に包み込むことができない。同様の表現型がglp-1(t s)突然変異により生成される胚について説明されている。

要約すると、pen-1及びpen-2突然変異は、Notchファミリーレセプターglp-1及びlin-12に關与する細胞シグナル伝達欠陥の表れである複数の表現型(Egl、Aph及び欠陥のある胚伸長)を共通にもつ。更に、sel-12、pen-1及びpen-2との組み合わせは、加えて、より強力なNotch系に關連する欠陥(gl p - 1様生殖不能、2つのアンカー細胞表現型;産卵口の外がえし)を生じる。一体とした遺伝子的及び表現型的証拠は、pen-1及びpen-2がNotchレセプター成熟及び/又はプロセッシングにおけるプレセニリンを抑制しうる新規な成分であることを示す。

10

【0044】

pen-1は、予測される線虫の遺伝子VF36H2L.1に相当する。pen-1をクローニングするために、我々は、ますます小さな間隔でpen-1(ep140)の遺伝子地図を、まず検出可能な遺伝子マーカーを用いて、次いで分子マーカーを用いて[Tc1トランスポゾンの挿入及び単一ヌクレオチド多型(SNPs)]作成した。SNPマッピングの最終段階は、その位置を染色体Iで52KB間隔まで狭くした。線虫のデータベースACEDBに記録されるように(Eeckman, F. 及び Durbin, R. C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism (1995) pp. 583-599)、この間隔は全体で7つの予測される遺伝子を含む。これらの1つ、VF36H2L.1は、RNA干渉(RNAi)のデータと突然変異の検出に基づいてpen-1であると同定された。多くの線虫遺伝子について、RNAiは母性及び接合遺伝子活性の両方を乱す(Tabara, H.等 Science (1998) 282: 430-431)。pen-1の場合には、成体の雌雄同体へのdsRNAの注入後の母性活性の破壊は、Aph表現型で発生的に停止させた胚の作成によって証明された。期待されるように、この表現型は野生型及びsel-12雌雄同体の両方のRNAiの後に観察された。何れの背景でもRNAiはまた、成体期まで成長する多くの明らかな死を免れた子孫を得た。sel-12の背景でのRNAiの場合には、高い比率のこれらの死を免れた個体は、glp-1様生殖不能を示し、接合pen-1活性の阻害と一致する。意外なことに、野生型のVF36H2L.1のRNAiはGlp生殖不能の子孫を生じるが、sel-12雌雄同体のpen-1RNAiによるものよりも非常に低い頻度である。対照的に、glp-1様生殖不能はpen-1単一突然変異には見られない。この違いは、RNAiが典型的に母性及び接合遺伝子機能を共に混乱させる特性に最も帰因し、従って接合性の致死突然変異に見られるよりもより深刻な表現型を生じうる。

20

30

【0045】

配列分析によって、我々はsel-12エンハンサーとして単離した4つのpen-1対立遺伝子がVF36H2L.1オープンリーディングフレームの単一のヌクレオチド置換を含むことを決定した。著しくこれら4つの独立した由来の領域は、それぞれ同じコドン、Trp191のナンセンス突然変異である。これらの対立遺伝子(ep140、ep168、及びep170)は、3番目の塩基UGGのUGAへの変更であり、4番目(ep216)は2番目の塩基UAGのUGGへの変化である。これらの領域がVF36H2L.1のRNAiに類似したAph及びglp-1様生殖不能表現型を生じることは、それらが機能減少突然変異であることを示す。

40

【0046】

pen-1は複数の膜貫通ドメインで進化的に保存されたタンパク質をコードする。pen-1(VF36H2L.1、GI#2815036)オープンリーディングフレームは、スプライシングしたときに308アミノ酸のタンパク質をコードする4つのエキソンに

50

分けられる。我々は、部分的な cDNA 産物の配列分析によって、エキソン 2 及び 3 の予定されるスプライシング結合を確認した。pen - 1 は、以下に詳細に説明されるように様々なヒト、マウス、及びショウジョウバエのタンパク質の予測される構造との類似性を示す。pen - 1 は、構造予測プログラム P S O R T 2 及び T o p P r e d 2 によって決定されるように最大 7 つの膜貫通ドメインまで含む、予測される完全な膜タンパク質である。

【0047】

pen - 2 は、予測される線虫遺伝子 T 2 8 D 6 . 9 に相当する。我々は、クローン化遺伝子 pha - 1 及び dpy - 1 8 の間の染色体 III に遺伝学的に位置づけた。この間隔はおよそ 240 KB の DNA に及び、A C E D B バージョン 9 に記録されるように (E e c k m a n , F . 及び D u r b i n , R . C . e l e g a n s : M o d e r n B i o l o g i c a l A n a l y s i s o f a n O r g a n i s m (1 9 9 5) p p . 5 8 3 - 5 9 9) 3 1 の予測される遺伝子を含む。pen - 2 は RNAi データ及び突然変異検出に基づいて T 2 8 D 6 . 9 であると同定された。その間の多くの遺伝子の RNAi は、T 2 8 D 6 . 9 が RNAi によって予測される母性及び接合 pen - 2 表現型が与えられる唯一の候補遺伝子であると同定した。T 2 8 D 6 . 9 を注入した野生型及び sel - 1 2 雌雄同体は、高い割合の発達停止胚を生成し、その多くが Aph である。更に、sel - 1 2 (野生型以外)の虫の RNAi は glp - 1 様の生殖不能を示す明らかな「死を免れた」子孫を生じる。sel - 1 2 エンハンサーとして単離された 3 つの pen - 2 対立遺伝子の突然変異検出は、それぞれが T 2 8 D 6 . 9 の予測されるオープンリーディングフレームのナンセンス突然変異を含むことを明らかにした。2 つの領域 (ep 2 1 9 及び ep 2 2 0) は、UGG から UGA (ep 2 1 9) 又は UAG (ep 2 2 0) に変えて Trp 7 4 コドンを変化させ、3 番目の領域 (ep 2 2 1) は Trp 3 6 を UGA 停止コドンに変える。これらのナンセンス対立遺伝子は、遺伝子機能を強力に減少させる又は消滅させて、sel - 1 2 の増強が野生型 pen - 2 + 活性の喪失に起因することを示す。

【0048】

pen - 2 は予測される複数回膜貫通タンパク質をコードする。pen - 2 (T 2 8 D 6 . 9 , G I # 3 8 7 3 4 1 5) オープンリーディングフレームは 1 0 1 アミノ酸タンパク質をコードする。pen - 2 の予測されるエキソン/イントロン構造は、Genbank 30 にある公にされていない全長 cDNA (y k 5 6 9 h 5 G I # 5 5 7 2 3 2 5 及び 5 5 5 8 5 5 7) の配列により確かめられた。pen - 2 は、以下に詳細に説明されるように、様々なヒト、マウス、ラット、及びショウジョウバエのタンパク質の予測される構造と高いレベルの類似性を示す。pen - 2 は、構造予測プログラム P S O R T 2 及び T o p P r e d 2 により決定されるように、2 つの見込みの膜貫通ドメインを含む、予測される完全な膜タンパク質である。

それら独自の特定の表現型及び sel - 1 2 とのそれらの相互作用を含む、幾つかの推定に基づき、pen - 1 及び pen - 2 はおそらくプレセニリンと相互作用する産物をコードする。引いては、pen - 1、pen - 2、sel - 1 2、又は hop - 1 と共通の特性を有する他の遺伝子を、潜在的なプレセニリン相互作用遺伝子とみなすことができる。40 我々は、1) aph - 2 + 機能の欠損と関連する特定の表現型及び 2) aph - 2 と sel - 1 2 及び hop - 1 との、及び pen - 1 及び pen - 2 との新規な遺伝学的相互作用の我々による同定に基づいて、aph - 2 遺伝子をプレセニリン相互作用遺伝子と同定した。

【0049】

aph - 2 遺伝子は、C . G o u t t e 等 (1 9 9 5 I n t e r n a t i o n a l W o r m M e e t i n g , a b s t r a c t 3 9 ; 1 9 9 8 E a s t C o a s t W o r m M e e t i n g , a b s t r a c t 1 5 1 ; W o r m B r e e d e r ' s G a z e t t e 1 2 (5) : 2 7 (1 9 9 3) ; W o r m B r e e d e r G a z e t t e 1 3 (d) : 8 3 (1 9 9 4)) によって線虫胚の glp - 1 媒介性シグナル伝達の 50

可能性のある成分として同定された。これらの研究者により特徴付けられた *aph-2* 突然変異は、未報告の接合表現型を有するが、*Aph* 表現型を含み *glp-1(ts)* 胚の欠陥と著しく類似する母性胚欠陥を有する。*aph-2* は、報告によれば、予測される遺伝子 ZC434.6 に相当する。予測される *aph-2* タンパク質は、721 アミノ酸長であり、PSORT2 (Nakai K., 及び Horton P., Trends Biochem Sci, 1999, 24:34-6) 及び TopPred2 (Claros MG, 及び von Heijne G. Comput Appl Biosci 1994 Dec; 10(6):685-6) により予測されるようなシグナル配列及び 1~3 の膜貫通ドメインによって特徴づけられる。

【0050】

pen-1 及び *pen-2* を同定するスクリーニングは *aph-2* の突然変異を引き起こさなかった。このスクリーニングの高いストリンジェンシーにより失敗しうる潜在的なプレセニリン/*aph-2* 相互作用を同定するために、我々はプレセニリン欠損にさらに高度に感作させる様々な遺伝学的背景を調べた。これらの実験について、入手可能な *aph-2* 突然変異体が不足していたことにより、我々は、選択される背景の *aph-2* + 機能を減少させる RNAi を用いた。野生型雌雄同体の生殖細胞系への *aph-2 dsRNA* の注入は、子孫に高く浸透した胚の致死率、並びに *Aph* 表現型を示す多くの停止した胚をもたらす。しかしながら、注入した雌雄同体はさらに、体細胞組織の表現型の異常のない成体に成長する相当な割合の生存能力のある子孫を産む。それらの多くが発達停止 *Aph* 胚を産むので、これらの虫は「一時的に死を免れたもの」とみなすことができる。従って、我々は成体の雌雄同体に *aph-2 RNAi* を注入し、プレセニリン依存表現型の一時的な死を免れた子孫を調べた。これらの調査の結果を表 4 にまとめる。

【0051】

表 4 *aph-2 RNAi* によるプレセニリン及び *pen* 遺伝子表現型 (導入遺伝子の死を免れた子孫の表現型) の増大

| 遺伝子型 1 | 接合性表現型 (<i>aph-2 RNAi</i> なし) | <i>aph-2 RNAi</i> 後の 接合性表現型 |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| 野生型 | 野生型 | 野生型 |
| <i>sel-12Δ</i> | 産卵欠陥 | 産卵欠陥 |
| <i>sel-12Δ;hop-1(ep168)/+</i> | 産卵欠陥 | <i>glp-1</i> 様生殖不能(12%) |
| <i>hop-1(ep171)3</i> | 低い浸透率 <i>glp-1</i> 様生殖不能(<1%) | <i>glp-1</i> 様生殖不能(>50%) |
| <i>pen-1(ep140)</i> | 産卵欠陥 | <i>glp-1</i> 様生殖不能(>50%) |
| <i>pen-2(ep220)</i> | 産卵欠陥 | <i>glp-1</i> 様生殖不能(>50%) |

1 XX 雌雄同体の完全な遺伝子型は次のとおりである: Row 1: N2 (野生型)。Row 2: *sel-12(ep6)*。Row 3: *sel-12(ep6);hop-1(ep168)unc-74(x19)/hT2[hop-1+unc-74+]*。Row 4: *hop-1(ep171)unc-74(x19)*。Row 5: *unc-29(e1072)pen-1(ep140)* Row 6: *pen-2(ep220)dpy-18(e364)*。

2 ホモ接合又はヘテロ接合系統からの雌雄同体は *aph-2 dsRNA* を注入した。全ての遺伝子型は、発達停止した *Aph-2* 胚、並びに一部の生存する死を免れた子孫を分離した。*aph-2(RNAi)* が死を免れた子孫のうち接合 *Glp-1* 様生殖不能を生じる遺伝子型について、*Glp* 生殖不能の虫の概算の割合を示す。

【0052】

ホモ接合 *sel-12* を背景とする *Aph-2 RNAi* は、より深刻なプレセニリン表現型に *sel-12* を目立って増強しない。しかしながら、有意な増強は、*hop-1* ナ

ンセンス突然変異 (*hop-1* (*ep168*) / +) にとってもホモ接合であるホモ接合 *sel-12* の虫で検出される。*aph-2 RNAi* に併せて、約 12% の *sel-12* ; *hop-1* (*ep168*) / + の動物は *glp-1* 様生殖不能を示し、*aph-2* のない状態でこの遺伝子型には何も見られない。更に、*aph-2 RNAi* の増強は、*sel-12* で相互作用が見られないので、両方のプレセニリンの複合した減少に依存する。

aph-2 との更なる相互作用は、異常な *hop-1* 対立遺伝子、*ep171* で観察される。この対立遺伝子は、ヒト *PS1* の *Asp385* 残基 (TMドメイン 8 に位置する) に相当する保存されたアスパラギン酸残基で D から N へのミスセンス変異をもたらす。*PS1 Asp285 Ala* 突然変異は、*PS1* 機能の喪失を生じ、*PS+* 発現でのドミナントネガティブは効果もまた有する (Wolfe, M. Nature (1999) 398 : 513 - 517)。 *PS1 D385A* 変異のように、*hop-1* (*ep171*) は野生型のプレセニリン活性を持たず ; *sel-12* ; *hop-1* (*ep171*) 二重突然変異は、*sel-12* ; *hop-1* に類似する *glp-1* 様の生殖不能欠陥を有する。*sel-12+* の背景において、*hop-1* (*ep171*) は非常に低い浸透度 (< 1%) の *glp-1* 様生殖不能表現型を生じ、*sel-12* プレセニリン機能又は発現でのドミナントネガティブな効果を有するはずであると示唆する。我々は、ホモ接合 *hop-1* (*ep171*) 雌雄同体 *aph-2* の *RNAi* が高い浸透度の *glp-1* 様生殖不能 (> 50% の生存子孫) を生じることを発見し、減少した *aph-2+* 機能及び *hop-1* (*ep171*) ドミナントの効果の間に強い付加的な相互作用が示唆される。

【0053】

最後に、我々はまた、*aph-2 RNAi* が *pen-1* 及び *pen-2* 突然変異表現型を強力に促進することを観察した。ヘテロ接合系統から分離するホモ接合成体 *pen-1* 及び *pen-2* 雌雄同体は、正常にみえる生殖系列を有し、*glp-1* 様生殖不能が見られない。対照的に、相当する *pen-1* ; *aph-2* (*RNAi*) 及び *pen-2* ; *aph-2* (*RNAi*) 雌雄同体は高い浸透度 (> 50% の生存 *pen-1* 又は *pen-2* 雌雄同体の子孫) で *glp-1* 様生殖不能を示す。これらの観察は、部分的に減少したプレセニリン系活性の様々な遺伝学的背景が、*aph-2* 活性の *RNAi* 媒介減少によるより強い表現型に増強することが可能であることを示唆する。データは、プレセニリン及び *pen-1* 及び *pen-2* と *aph-2* の機能的相互作用を示す。

APH-2 の構造及び *APH-2* はヒト及びハエのタンパク質に関連する。*APH-2* は、*PSORT2* で予測される切断可能なシグナル配列及び *PSORT2* 及び *TopPred2* により予測される 1 ~ 3 の膜貫通ドメインを含む。*APH-2* は、ほぼ全長の *cDNA KIAA0253* によりコードされる予測のヒトタンパク質とアミノ酸配列において 18% の同一性である (Nagase, T. 等 DNA research (1996) 3 : 321 - 329)。更に、*APH-2* は、Exelixis 社で作成されたコンテイング化された ESTs から予測されるショウジョウバエのタンパク質に対して同様のレベルの同一性を示す。ヒト及びショウジョウバエの *APH-2* 関連タンパク質は 30% 同一であり、3 つのタンパク質の Clustal アライメントは各タンパク質の完全長にわたる保存を示す。

【0054】

方法 : *RNA* 干渉 (*RNAi*)。特定の遺伝子の *RNAi* は、一般に PCR 増幅遺伝子 DNA 断片の鋳型から調製された dsRNA を用いてなされた。PCR プライマーの 5' 末端は T7 *RNA* ポリメラーゼのプロモータ配列を含み、3' 領域は、標的とする遺伝子の一以上のエキソンをそれらが増幅するように作成された。PCR 反応は、50 ml 反応で 0.5 mg の野生型ゲノムと 5 m モルの各プライマーを用い、拡張キット (Expand kit) (Roche Biochemicals, Summerville, NJ) を使用して製造業者のプロトコールに従って為された。PCR 条件は次の通りであった : 95 で 30 秒間の初期変性、続いて 35 サイクルの 94 で 30 秒間、55 で 15 秒間、72 で 1 分間、最終伸長 72 で 3 分間。増幅した DNA は、エタノール沈殿させ

10

20

30

40

50

、20 mlのRNAseを含まない水に再懸濁した。PCR産物の部分を、製造業者の指示書(Promega社)に従ってT7ポリメラーゼ関連インビトロ転写反応の鋳型として使用した。反応物をエタノールで懸濁し、RNAを20 mlのRNAseを含まない水と10 mlの3X IM緩衝液(20 mMのKPO₄ pH7.5、3 mMのK+クエン酸塩 pH7.5、2%のPEG6000)に再懸濁した。相補的なセンス及びアンチセンスRNAsを68 で10分間のインキュベーション、続いて37 で30分間インキュベーションによりアニールし、次いで0.45 µmのセルロースアセテートフィルターをとおして遠心分離した。RNAの微量注入は、L4又は若い成体期の雌雄同体を用いての記載(Fire等, Development(1991)113:503-514)のように行った。注入した虫をM9バッファー(リットル当たり:30 gのNa₂HPO₄、15 gのKH₂PO₄、2.5 gのNaCl、5 gのNH₄Cl)に10-30分間回収し、個々のプレートに移し、次いで毎日新しいプレートに移した。注入した雌雄同体の第1世代の自己子孫は、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を備えた複合顕微鏡又は解剖顕微鏡で観察することによりRNAi誘発の表現型を調べた。

10

【0055】

使用される線虫の系統。線虫を処理及び培養する方法は記載がある(Brenner, S. Genetics(1974)77:71-94)。線虫のバリエーション、Bristol系統N2は野生型を示し、ここで使用されるほとんどの突然変異株と大部分がアイソジェニックである。遺伝子地図作成及び特徴付けに使用された特定の突然変異は: LGI-unc74(x19)、dpy-5(e61)、unc-29(e1072)、fog-3(q443)、dpy-24(s71)。LGIII-dpy-19(e1259ts)、unc-119(e2498)、pha-1(e2123)、dpy-18(n499又はe364)LGIV-him-8(e1489)、LGXlon-2(e678)を含んでいた。全ては線虫IIで説明される。sel-12又はhop-1コード領域の大部分又は部分を除去する欠失突然変異は、以下に説明される。sel-12遺伝子は伴性であり、sel-12突然変異は交配欠陥があるので、系統の間のsel-12の移動は、通常、相補的なsel-12+対立遺伝子をもつ染色体増幅mndp66(X;I)を持つ雄を用いて成された。

20

【0056】

DHPLCによるSNPスクリーニング:候補SNPsをCB4856及びN2ゲノムDNAから分離して増幅した。PCR産物を混合、変性及び再アニールして、変性DHPLC(DHPLC)によるスクリーニングのためのヘテロ接合分子を作成した。各SNPを同一の分離勾配を用いて5つの異なる温度でスクリーニングした。SNPを、ヘテロ二本鎖がヘテロ接合状態で検出されるが、ホモ接合の初期の系統では検出されない場合に信頼できる結果とした。各SNPの適切な温度を記録し、組み換えした虫のSNPをスクリーニングするために使用した。

30

組み換えした虫のSNPスコアリング:適切な組み換え体からのライセートをPCRによりSNPsを増幅するためのゲノムDNA鋳型として用いた。次いで、これらの粗製のPCR産物を、先に決定した各SNPの適した温度を用いてDHPLCを実施した。各組み換え体について、各SNPをタイプし、無作為に表計算シートに入力した。次いでSNPsの物理的次數をAceDBから決定した。これは各組み換え体のハプロタイプを作り、組み換えが生じる位置を意味した。

40

【0057】

sel-12及びhop-1突然変異株の単離及び特徴付け。sel-12及びhop-1の欠失対立遺伝子を、Plasterkの2段階法(Plasterk, R. C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism(1995)pp. 59-80)によってTc1トランスポゾン変異誘発活性源としてmut-2を用いて得た。sel-12(ep6)(以下sel-12と称する)はsel-12オープンリーディングフレームのアミノ酸34から441がなくなる欠失突然変異である。hop-1(ep90)(以下hop-1と称する)は、

50

hop - 1 オープンリーディングフレームのアミノ酸 216 で始まり、遺伝子の 3' 非翻訳領域で終結する 722 bp の欠失である。sel - 12 及び hop - 1 単一突然変異を、表現型の特徴付け及び二重突然変異の構築の前に少なくとも 10 回、野生型 (上掲の線虫のバリエーション、Bristol 系統 N2) に戻し勾配した。sel - 12 単一突然変異は、前記した sel - 12 (lf) 突然変異のものと同様の産卵欠陥表現型を有する (Lavitan, D. 及び Greenwald, I. Nature (1995) 377: 351 - 354)。hop - 1 突然変異は、他で記載される (Westlund, B. 等 Proc. Natl. Acad. Sci (1999) 96: 2497 - 2502) hop - 1 欠失対立遺伝子と同様に、肉眼的な表現型の異常はない。

10

母性 sel - 12 + 活性を欠く sel - 12 ; hop - 1 二重突然変異源を与えるために、我々は、平衡にした sel - 12 / sel - 12 ; hop - 1 + / + unc - 74 系統を構築した。この系統は、glp - 1 (lf) 突然変異の特性をもつ生殖系統増殖欠陥を有する完全な浸透度の生殖不能表現型を示す二重突然変異 sel - 12 ; hop - 1 雌雄同体を分離する (Austin, J. 及び Kimble, J., Cell (1987) 51: 589 - 599)。更に、これらの虫は十分な浸透度の 2 つのアンカー細胞表現型及び lin - 12 (lf) 突然変異により引き起こされる産卵口欠陥を思わせるめくれた産卵口表現型を有する。

【0058】

sel - 12 のエンハンサーの単離。pen - 1 及び pen - 2 のエンハンサー対立遺伝子は、ホモ接合 sel - 12 系統、又は後の実験において sel - 12 ; unc - 74 (x19) 系統 (unc - 74 突然変異は染色体 I 上の hop - 1 の近くにあり、組み込みの (built-in) 地図作成の材料を提供する) の突然変異誘発の後に得られる。何れの遺伝子型の XX 雌雄同体も、記載されるように (Brenner, S. Genetics (1974) 77: 71 - 94) エチルメタンスルホン酸で突然変異誘発し、1 (又は時には 2) の雌雄同体を個々の生育プレート (全部で約 55,000 プレート) につまみ出した。3 から 5 日後、プレートを生殖系統増殖の欠陥を示す「暗い」外観を有する生殖不能 F2 子孫の外観について選別した。次いで候補生殖不能突然変異を sel - 12 ; hop - 1 の虫と同様の glp - 1 様生殖不能を示すものを同定するノマルスキー微分干渉顕微鏡により選別した。

20

30

【0059】

この方法で決定した 44 の候補の集団を、これらの突然変異の生殖不能表現型が sel - 12 エンハンサーに予想されるような虫の sel - 12 表現型に依存するかどうかを決定するために設計された交配計画を実施した。この試験のために、各候補を dpy - 19 I I ; him - 8 ; lon - 2 の雄に交配させ、生じた交配子孫を個々のプレートにつまみ出した。次の世代において、lon - 2 / lon - 2 子孫 (組み換えのない sel - 12 + / sel - 12 + である) の存在は、生殖不能表現型が sel - 12 + 活性の欠損に依存しない、あるいは既知の glp - 1 系遺伝子 (glp - 1, lag - 1, lag - 2) のものの突然変異が原因であることを示唆する。この方法で分析された 29 の候補は sel - 12 非依存性であり、従って、おそらくプレセニリンエンハンサーとしては拒否された。29 の拒否候補の 26 について、生殖不能を引き起こす突然変異はトランスで dpy - 19 に分離され、glp - 1 対立遺伝子に予測される作用である。これらの L G I I I 突然変異の 9 つは、既知の glp - 1 対立遺伝子の生殖不能表現型を補足することができず；他の 17 L G I I I 突然変異は試験しなかった。

40

残りの 15 の候補について、Glp 生殖不能表現型は F2 世代には見られず、結果は、sel - 12 との相互作用を母性 sel - 12 + 活性によりレスキューするエンハンサー突然変異の存在と一致する。この解釈は、個々のプレートの F2 世代の sel - 12 / sel - 12 の虫を選び出し、次世代の glp - 1 様生殖不能の再出現についてそれらの子孫を調べることにより試験された。これは、残り 15 の候補のそれぞれについて得た結果であった。相補性試験の組み合わせ、減数分裂マッピング、突然変異体対立遺伝子の配列分

50

析によって、各候補は *hop-1* (8 候補) 或いは 2 つの新しく同定された遺伝子、*pen-1* (4 候補) 又は *pen-2* (3 候補) の何れかの突然変異を持つことが示された。

【0060】

pen-1 のマッピング、特徴付け、クローニング、及びコンピュータ分析：*pen-1* の遺伝子地図の作成を、*sel-12* の背景において行い、二重突然変異 *pen-1* ; *sel-12* の虫の *glp-1* 様生殖不能表現型を基にした。我々は、初めに染色体 I の *unc-29* 及び *dpy-24* の間に *pen-1* (*ep140*) を位置づけた。更に可視マーカーでのマッピングは *unc-29* 及び *fog-3* の間、1.1 MB の間隔に位置を狭めた。遺伝子型 *pen-1* の雌雄同体 / *unc-29 fog-3* トランス雌雄同体から、16 / 20 *Unc-29 non-Fog-3* 組み換え及び 1 / 4 *Fog-3 non-Unc-29* 組み換えは *pen-1* を分離した。 10

【0061】

pen-1 突然変異が誘導される N2 *Bristol* 系統と、線虫の系統 CB4856 *Hawaiian* 系統の間で多形である SNP マーカーを用いて更に細かいマッピングを行った。ゲノム配列決定センター (セントルイス、MO) は、多数の CB4856 の潜在的な SNPs を同定した (<http://genome.wustl.edu/gsc/CEpolymorph/snp.shtml>)。 *unc-29* から *fog-3* 間のこれらの潜在的な 4 つの SNPs は、HPLC を変性させることによりヘテロ二本鎖 PCR 産物の分離に基づく SNP 遺伝子型同定アッセイで試験することにより確認された (*Underhill PA, et al, Genome Res. 1997 Oct; 7(10): 996-1005*)。これら SNPs に対する初期マッピングは、遺伝子型 *unc-29 pen-1* / CB4856 又は *pen-1 dpy-24* / CB4956 の雌雄同体の構築、及び *Unc-29 non-Pen-1* 又は *Dpy-24 non-Pen-1* 組み換え体の選択により為された。さらなる *non-Pen-1* 組み換え体は *unc-29 pen-1 fog-3* / CB4856 ヘテロ接合体から単離された。50 の *Unc-29 non-Pen-1* 組み換え体のうちの 9 つは、C31H5 SNP の右に生じ、*pen-1* をこのマーカーの右に位置させる交差を有していた。45 の *Dpy-24 non-Pen-1* 又は *Fog-3 non-Pen-1* 組み換え体のうちの 4 つは、F14B4 SNP の左に交差を有して、*pen-1* をこのマーカーの左に位置させていた。複合したデータは、C31H5 と F14B4 SNPs の区間、~240 KB の間に *pen-1* を位置づけた。 20 30

【0062】

同様の間隔に *pen-1* をマッピングするために、C45G3 から F14B4 の間にある更なる SNPs を DNA 配列決定により同定した。間にある DNA の約 2 KB の 6 つのセグメントを N2 及び CB4856 ゲノム DNA 及び配列決定された末端の PCR により増幅した。場合によっては、更なる配列決定プライマーは開始配列を作成するのに使用された。N2 と CB4856 の間の SNPs を配列アラインメントにより同定し、~200 bp の PCR 産物をそれぞれ質のよい候補の周りに作成した。これらの 200 bp の産物をスクリーニングし、上記のように DHPLC により記録した。この分析は *pen-1* を 2 つの SNPs、一方がコスミド C45G3 と他方がコスミド F36H2 の間に位置づけ、相互に約 52 KB のところにある。 40

【0063】

突然変異の検出。2 つの一本鎖ヌクレオチド多形 (SNPs)、標識した C45G3A 及び F36H2A は、7 つの予測される候補遺伝子が存在する 52 kb のゲノム間隔、*pen-1* を決定した。この 52 kb の間隔の 30 kb 遺伝子の多い部分が、この領域に遺伝学的に位置づけされる突然変異を有する 3 つの虫、*ep140*、*ep169*、及び *ep170* で示された。全ての DNA 配列決定反応を BigDye 配列決定試薬 (*Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA*) の標準的なプロトコルを用いて実施し、産物を ABI377 DNA 配列を用いて分析した。ABI377 DNA 配列から得られたトレースデータを分析し、Phred-Phrap 50

プログラム (Gordon, Genome Res. (1998) 8:195-202) を用いてコンテグに構築した。次いで再配列のデータを野生型の系統、N2と多形性について比較した。この分析は、第3位の塩基の変化、GからAを3つのpen-1対立遺伝子、トリプトファン(W)から停止(*)までアミノ酸変化を生じるep140、ep169及びep170のVF36H2L.1遺伝子(GI#2815036)の191AAで同定した。マッピングされていない突然変異体の更なる配列分析は、同じコドンの虫ep216の他の突然変異を明らかにするが、第2の部分ではGからAもまた、同じアミノ酸変化となる。ヒトpen-1の分析により新規なpen-1Bタンパク質を同定することができた。

【0064】

pen-2のマッピング、特徴付け、クローニング、及びコンピュータ分析。我々は、最初にpen-2(ep220)を染色体IIIのunc-25の左に位置づけた。遺伝子型pen-2/dpy-18unc-25の雌雄同体から、4/4non-Dpy-18Unc-25組み換え体はpen-2を分離し、0/21Dpy-18non-Unc-25組み換え体はpen-2を分離した。70のdpy-18unc-25ホモ接合体が同一のヘテロ接合体雌雄同体、2つのみの分離されたpen-2から選択され、pen-2がdpy-18の比較的近区にあり、或いはこの遺伝子の左にあることが示唆される。

pha-1及びdpy-18の間にpen-1を位置づけする更なるマッピング：pen-1/pha-1dpy19;sel-12雌雄同体から、1/14non-Pha-1Dpy-1組み換え体はpen-2を選択した。これらのデータは、pen-2をpha-1及びdpy-18の間、約240KBの間に位置づけ、pen-2がdpy-18の近くにあることを示唆した。

【0065】

予測遺伝子T28D6.9としてのpen-2の同定：我々は、1)pha-1からdpy-18の間の予測遺伝子のRNAi及び2)突然変異検出に基づいて、pen-2が予測遺伝子T28D6.9(GI#3873415)であることを決定した。その間の31の遺伝子の28について、T7プロモータ配列を付随するプライマーを、上記されるような鑄型として第一鎖cDNAプール又はゲノムDNAの何れかを用いた選択されるコーディング領域の増幅に使用した。2本鎖RNAを各PCR産物から合成し、sel-12ホモ接合体に注入した。T28D6.9のRNAiは注入した虫の子孫のうち予期されるpen-2表現型を作り、sel-12の虫のglp-1様生殖不能、並びにN2及びsel-12の虫への注入の後のAph胚停止表現型を含む。T28D6.9オープンリーディングフレームの突然変異検出は、3つのpen-2対立遺伝子(ep219、ep220、ep221)のそれぞれでナンセンス突然変異を同定した。概略すると、このグループ、ep220の単一突然変異をep220ライゼート及び野生型系統で増幅したPCR産物を配列決定することにより試験した。この分析は、トリプトファン(W)から停止(*)で生じた74AAのGからAへの突然変異を同定した。位置づけされない突然変異の更なる配列分析は、このグループに2以上の突然変異があることを明らかにした。ep219の虫はWから*を作る74AAの3番目の位置にGからAへの変異を有する。ep221の虫は36AAの停止コドンにも生じる他のWでGからAへの変異を有する。これら3つの変異は全て、T28d6.9遺伝子の機能を有意に変化させ又は除去することができる、高度に保存されたトリプトファンに影響する。

【0066】

V. 細胞を利用したレポーターアッセイ

我々は、Gal4VP16転写活性化タンパク質に融合するAPPのC末端の99アミノ酸を持つレポーター構造を利用した細胞培地 分泌酵素アッセイを開発した。Gal4部分は、プレセニリン依存切断がそれを遊離して核に移動させ、UASルシフェラーゼレポーター導入遺伝子の転写を活性化するまで、APP膜貫通ドメインによって細胞表面に維持される。アッセイ確認実験において、既知の分泌酵素阻害剤はレポーター遺伝子活性

10

20

30

40

50

を完全に阻止し、既知のドミナントネガティブプレセニリン突然変異はまた、レポーター活性を阻害した。概念的に類似したアッセイは、以前、U A S ガラクトシダーゼ導入遺伝子レポーターを用いたインビボのショウジョウバエでの研究が示されている。ガラクトシダーゼレポーター遺伝子活性、従ってさらに 分泌酵素様プロテアーゼ活性は、このインビボアッセイにおけるプレセニリンの存在に完全に依存していることが示されている。

【0067】

我々のデータは、pen - 1、pen - 2、aph - 2 又はプレセニリンの阻害が定常状態のプレセニリタンパク質レベルの強力な減少、及び 分泌酵素活性の相関した減少を生じることを示す。pen - 1 又は aph - 2 阻害の効果は等しい強さであり、pen - 2 は 分泌酵素活性の減少及びプレセニリタンパク質減少の両方に関してほぼ同等の強さが、そのプレセニリン阻害である。プレセニリン減少は、ショウジョウバエ及びヒト細胞システムを含む複数の細胞を利用したシステムにおいて、RNAi、開示されるスクリーニングで同定される複素環式化合物、及び細胞内発現抗体を含む幾つかの阻害剤を用いて立証される。これらのデータは、pen 遺伝子及びプレセニリンの機能的相互作用についてのアッセイを提供する。従って、本発明は、プレセニリンとプレセニリンエンハンサー (pen) ポリペプチドの機能的相互作用を変化させるストレスを特異的に検出するための、プレセニリンと pen ポリペプチドの機能的相互作用を与えるシステムに予測されるストレスを導入することによる方法を提供し、よってシステムはプレセニリンと pen ポリペプチドのストレス偏向性相互作用を与え、ストレスのない状態で、システムはプレセニリンと pen ポリペプチドの不偏性相互作用を与え；システム内のプレセニリンの量の変化としてプレセニリンと pen ポリペプチドのストレス偏向性相互作用を検出し、量はプレセニリンN又はC末端断片 (NTFs) プレセニリンホロタンパク質の量、又はその割合として表されてもよく、ストレス偏向性及び不偏性相互作用の間の差異は、ストレスがプレセニリンと pen ポリペプチドの相互作用を変化させることを示す。

10

20

【0068】

この明細書において引用した全ての刊行物及び特許出願は、各刊行物もしくは特許出願が特にまた個々に出典明示により取込むことが示されているかのごとく、出典明示によりここに取込む。上述した発明は、理解を明瞭にする目的で、例証及び実施例によりある程度の詳細さをもって記載したが、特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱しない限りそれに所定の変化と変更を加えても良いことは本発明の教唆から当業者にとって明らかであろう。

30

【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
15 November 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/85912 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
 (21) International Application Number: PCT/US01/14648
 (22) International Filing Date: 3 May 2001 (03.05.2001)
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data: 09/568,942 5 May 2000 (05.05.2000) US
 (71) Applicant (for all designated States except US): EX-ELIXIS, INC. [US/US]; 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US).
 (72) Inventors; and
 (75) Inventors/Applicants (for US only): CURTIS, Daniel, Tim [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). FRANCES, George, Ross [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). ELLIS, Michael, Christopher [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). RUDDY, David, Andrew [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). NICOLLI, Sharon, Monique [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US).
 (74) Agent: OSMAN, Richard, Aron; Science & Technology Law Group, 75 Denise Drive, Hillborough, CA 94010 (US).
 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, TG).
 Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
 For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/85912 A2

(54) Title: PRESENILIN ENHANCERS

(57) Abstract: The invention provides methods and compositions relating to pen polypeptides having pen-specific structure and activity, related polynucleotides and modulators of pen function. The invention provides isolated pen hybridization probes and primers capable of specifically hybridizing with natural pen genes, pen-specific binding agents such as specific antibodies, and methods of making and using the subject compositions in diagnosis (e.g. genetic hybridization screens for pen transcripts), therapy (e.g. pen inhibitors to modulate APP processing) and in the biopharmaceutical industry (e.g. as immunogens, reagents for screening chemical libraries for lead pharmacological agents, etc.).

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Presenilin Enhancers

Inventors: Daniel Tim Curtis, George Ross Francis, Garth Joseph McGrath, Sharmon
Monique Nicoll, David Andrew Ruddy & Michael Christopher Ellis

5 Assignee: Exclixis Pharmaceuticals

INTRODUCTION

Field of the Invention

The field of this invention is proteins which modulate presenilin function.

10

Background

Alzheimer's disease is a degenerative disorder of the central nervous system which causes memory impairment and cognitive loss during mid to late life. The disease is characterized by two primary pathological features, extracellular amyloid plaques in the brain, and intra-neuronal neurofibrillary tangles. These lesions inhibit neuronal and glial cell function, and lead to synaptic loss and dementia. Both early and late onset forms of the disease have been shown to have genetic components, and four genes have been definitively associated with increased risk for AD: APP, PS1, PS2 and ApoE. These genes are functionally linked by their roles in the production, transport, and/or elimination of, amyloid- β ($A\beta$), the primary constituent of Alzheimer's amyloid plaques (reviewed in Selkoe, D. 1999, Nature 399 supp: A23).

15

20

Alzheimer's amyloid plaques are comprised largely of the 40-42 amino acid peptide $A\beta$ (Glennner, G. G., and Wong, C. W., 1984 Biochem. Biophys. Res. Commun. 122:1131). $A\beta$ is derived by proteolytic cleavage from the b-Amyloid Precursor Protein, or β APP (Kang J. et al. 1987, Nature 325:733). Three secretase activities cleave APP to generate the $A\beta$ peptide or a shorter, alternative cleavage product called p3. β -secretase generates the N-terminus of $A\beta$, while α -secretase cleaves internal to $A\beta$ sequences to generate the N-terminus of p3. γ -secretase cleaves the C-terminal β and α secretase products of APP to generate the heterogeneous C-terminal ends of $A\beta$ and p3. APP mutations found in familial Alzheimer's disease (FAD) pedigrees are clustered around the three secretase cleavage sites

30

WO 01/85912

PCT/US01/14648

(Goate, A., et al. 1991, Nature 349:704; Murrell, J., et al. 1991, Science 254: 97; Chartier-Harlin et al. 1991, Nature 353: 844; Mullan, M. et al. 1992, Nature Genet. 1: 345; Levy, E. et al., 1990, Science 248: 1124; Hendriks, L. et al. 1992, Nature Genet. 1:218) and they each increases total A β (A β 42 + A β 40) or increases the A β 42/40 ratio. Since A β 42 precipitates more readily in vitro and is the primary component of early forms of amyloid deposits called diffuse plaques, it has been postulated that increased systemic A β 42 could lead to earlier formation of plaque, and earlier onset of AD.

Family studies identified two other genes, presenilin-1 (PS1) and presenilin-2 (PS2), associated with dominantly inherited, early onset AD, (Sherrington, R. et al. 1995, Nature 375: 754; Levy-Lahad, E. et al. 1995, Science 269: 973; Rogaev, E. I. et al. 1995, Nature 376: 775). These proteins are similar to each other in sequence and encode polytopic membrane proteins with 8 transmembrane segments. Studies in FAD human cell lines, in transfected cells, and in transgenic mice have demonstrated that the PS FAD mutations cause a change in the processing pattern of APP, resulting in an increased ratio of A β 42/40 (Scheuner, D. et al. 1996, Nat. Med. 2: 864; Citron, M. et al. 1997, Nat. Med. 3:67; Borchelt, D. et al. 1996, Neuron 17: 1005; Duff, K. et al. 1996, Nature 383: 710; Tomita, T. et al. 1997, PNAS 94:2025). Studies on PS1 knockout mice demonstrated that loss of PS1 function leads to reduction in A β production due to a reduction of γ -secretase activity (De Strooper, B. et al. 1998, Nature 391: 387). Presenilin function is thus implicated in the activity of γ -secretase in two ways: missense mutations alter γ -secretase cleavage specificity, while loss of presenilin activity leads to loss of γ -secretase activity.

Inhibition of presenilin activity decreases A β production and is thus a potentially useful therapeutic approach to Alzheimer's disease. However, despite the functional link to γ -secretase activity and the generation of A β , the biochemical nature of PS activity is poorly understood. Various functions have been proposed, including action in the ER and/or Golgi complex as a chaperone for APP, Notch, and/or γ -secretase (Thinakaran, G. et al. 1998, Neurobiol. Dis. 4: 438), activity as a novel aspartyl protease, i.e. as γ -secretase itself (Wolfe, M. S. et al. 1999, Nature 398: 513), and potential roles in the response to oxidative stress and apoptosis (Wolozin, B. et al. 1996, Science 274:1710; vito, P. et al. 1997, J. Biol. Chem 272: 28315; Guo, Q., et al. 1997, J. Neurosci. 17: 4212). The absence of a clear functional assay increases the difficulty of designing useful small molecule therapeutics targeted at presenilin.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

An alternative strategy to targeting presenilin is to discover additional proteins which act together with presenilins in the pathway of γ -secretase and A β production and which might be more amenable to drug development. One useful method for the discovery of such novel targets is to perform genetic screens in model organisms such as *Drosophila* and *C. elegans* for genes that interact with presenilins.

5 Invertebrate orthologues of the PS genes have been identified by both sequence searches and genetic screens. The *C. elegans* genome contains three presenilin genes, *sel-12* (suppressor and/or enhancer of *lin-12*; Levitan, D. et al. 1995, *Nature* 377:351), *hop-1* (homolog of presenilin; Li, X. et al, 1997, *PNAS* 94:12204) and *spe-4* (spermatogenesis defective; LHernault et al., 1992, *J. Cell Biol.* 119:55). *sel-12*, *hop-1* and *spe-4* have 48, 35
10 and 23% sequence similarity, respectively, to PS1 and 2. *sel-12* and *hop-1* have overlapping functions in several tissues (see below), while *spe-4* appears to perform an independent function in the male germ line. Rescue experiments using transgenes have shown that human PS1 and PS2 can rescue phenotypes caused by loss of *sel-12*, demonstrating that presenilin function has been conserved from nematodes to mammals (Levitan, D. et al. 1996, *Nature*
15 377:351; Baumeister, R. et al. 1997, *Genes Function* 1: 149).

Sel-12 was identified genetically as a suppressor of an activated allele of the Notch gene *lin-12*. This discovery established a functional link between presenilin activity and activity of the Notch signaling pathway. In vivo experiments in mice (Herreman, A. et al. 1999, *PNAS* 96:11872), *Drosophila* (Struhl, G. et al. 1999, *Nature* 398: 522; Ye, Y. et al.
20 1999 *Nature* 398:525) and *C. elegans* (Li, X. et al, 1997, *PNAS* 94:12204; Westlund, B. et al. 1999, *PNAS* 96:2497) have demonstrated that the phenotype of complete loss of presenilin activity corresponds very well with the complete elimination of Notch signaling in the organism, suggesting that presenilins are absolutely required for Notch signaling activity. Notch receptors are single pass transmembrane proteins present at the cell surface that
25 mediate cell-cell signaling events critical to the differentiation of many embryonic and adult tissues in invertebrates and vertebrates. Signaling involves ligand-dependent cleavage of Notch at the inner face of the transmembrane segment, and subsequent nuclear translocation of the C-terminal domain. Analysis of Notch processing in cell culture and in vivo has further demonstrated that presenilins are required for the ligand dependent cleavage event that
30 releases the Notch intracellular domain from the transmembrane domain (Struhl, G. et al.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

1999, Nature 398: 522; De Strooper, B. et al. 1999 Nature 398: 518). The parallel requirement for presenilin in both the Notch and APP cleavages suggests that the Notch signaling pathway could be a useful surrogate assay in place of Ab production in screens for presenilin pathway genes.

5 Mutations in the *C. elegans* presenilins *sel-12* and *hop-1* result in phenotypes associated with defective signaling by the *C. elegans* Notch receptors *lin-12* and *glp-1*. Loss of *hop-1* alone results in no obvious phenotypes. Loss of *sel-12* results in a strong egg-laying defective phenotype and vulval defects reminiscent of *lin-12* mutations. Loss of both *sel-12* and *hop-1* produces more severe Notch phenotypes than seen in *sel-12* alone. The specific phenotypes observed in the *sel-12*; *hop-1* double mutants depends on whether these worms inherit maternal wild type presenilin activity. When maternally provided *sel-12*⁺ activity is present, the double mutant displays a novel egg-laying defective phenotype and all progeny arrest during embryogenesis with *glp-1*-like developmental defects. In the absence of maternal *sel-12*⁺ activity the double mutant exhibits a stronger phenotype of sterility with germline proliferation defects characteristic of *glp-1* mutants. Together, this set of properties indicates that *sel-12* and *hop-1* are partially redundant and act coordinately to promote signaling by the two *C. elegans* Notch receptors.

15 The partial redundancy between *sel-12* and *hop-1* activities made it possible to look for enhancers of *sel-12* loss of function alleles that would produce a phenotype equivalent to the *sel-12*;*hop-1* double mutant. This enhancer screen identified two new genes which were named *pen-1* and *2* (*pen* = presenilin enhancer) and which are required for presenilin function. Based on the phenotypes of the *pen* genes, we have identified a third presenilin enhancer gene, *aph-2*. The *pen-1*, *pen-2* and *aph-2* gene sequences identify orthologous genes in humans and other animals, including *pen-1B*. These genes and the processes they regulate are targets for the development of therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease.

25 Relevant Art

Sequences related to a human *pen-1* are found, inter alia, in WO9855508, WO9855508, WO9906554 and in Unigene CGI-78 (GI#6911522 and GI#4929623)

30 Sequences related to a human *pen-2* are found, inter alia, in AD000671 (genomic) and GI#3601371 (cDNA).

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Sequences related to a human Aph-2 are found inter alia, in WO 9845435, WO 9845436, WO 9300353 and (KJAA0253, DNA GI1665772, protein GI 1665773).

Numerous ESTs were found in public databases containing pieces of the natural human pen-1B sequence disclosed herein, including ns43g08.s1 (GI# 2874520, not annotated) and ESTs of Unigen contig Hs.42954 (53% similar to pen-1 (CGI-78)), including:

5 AIS38204 (IMAGE:2189986); AA808355 (IMAGE:1334417); N21153 (IMAGE:264868); AI204164 (IMAGE:1734840); AI001990 (IMAGE:1619191); AA578718 (IMAGE:953241); AA887975 (IMAGE:1160119); AI004282 (IMAGE:1626004); AI188040 (IMAGE:1738954); AI192033 (IMAGE:1738659); AI005113 (IMAGE:1626277); AW118908 (IMAGE:2605631); AI760754 (IMAGE:2398349); AA805770 (IMAGE:1186430); AA805757 (IMAGE:1186406); AW182071 (IMAGE:2662428);

10 AA805773 (IMAGE:1186436); AI301191 (IMAGE:1897253); AA976455 (IMAGE:1589895); and N31710 (IMAGE:271292).

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The invention provides methods, compositions and systems relating to presenilin enhancer proteins (pens), including methods for modulating (e.g. enhancing or inhibiting) and detecting presenilin-pen interactions. In a particular embodiment, the method provides for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of a presenilin enhancer (pen) with upstream or downstream Notch or APP processing by: (i) introducing a predetermined

20 stress into a system which provides a functional interaction of a pen with Notch or APP processing, whereby the system provides a stress-biased interaction of the pen with Notch or APP processing, wherein the absence of the stress, the system provides unbiased interaction of the pen with Notch or APP processing; and (ii) detecting the stress-biased interaction of the pen with Notch or APP processing, wherein a difference between the stress-biased and

25 unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen with Notch or APP processing.

The system may be a viable cell expressing the pen wherein the pen expression is determined to be non-natural or pathogenic, or an in vitro, cell-free mixture comprising a determined amount of the pen. A wide variety of embodiments are encompassed; for

30 example, wherein the system is the viable cell, in situ or in vitro, and the stress is a

WO 01/85912

PCT/US01/14648

pharmacologically active agent or a deficiency in functional expression of the pen, such as by virtue of genomic disruption of otherwise endogenous alleles encoding the pen or coexpression of a polynucleotide comprising a sequence antisense of an endogenous allele encoding the pen. Alternatively, the system may be the in vitro, cell-free mixture and the stress is a pharmacologically active agent. The stress-biased interaction of the pen with Notch or APP processing may be detected by any convenient means or marker, such as detecting an indication of Alzheimer's disease, a transcriptional reporter of notch, generation of a downstream product such as A β or a structural alteration in the pen, such as with a specific antibody.

The invention provides a variety of other methods and compositions relating to pen polypeptides having pen-specific structure and activity, related polynucleotides and modulators of pen function. The pen polypeptides may be recombinantly produced from transformed host cells from the subject pen polypeptide encoding nucleic acids or purified from natural sources such as mammalian cells. The invention provides isolated pen hybridization probes and primers capable of specifically hybridizing with natural pen genes, pen-specific binding agents such as specific antibodies, agonists and antagonists, and methods of making and using the subject compositions in diagnosis (e.g. genetic hybridization screens for pen transcripts), therapy (e.g. pen inhibitors to modulate A β production) and in the biopharmaceutical industry (e.g. as immunogens, reagents for isolating natural pen genes and transcripts, reagents for screening chemical libraries for lead pharmacological agents, etc.). In a particular aspect, the pen methods and compositions relate to pen-1B polypeptides.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention provides methods, compositions and systems relating to presenilin enhancer proteins (pens), including methods for modulating (e.g. enhancing or inhibiting) and/or detecting an interaction between a pen and Notch or APP processing. In a particular embodiment, the method provides for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of a presenilin enhancer (pen) with Notch or APP processing.

The pen is independently selected from a pen-1, pen-1B, pen-2 and Apt-2 polypeptide. These names are used generically to refer to polypeptides which comprise a

WO 01/85912

PCT/US01/14648

disclosed parental sequence, comprise specified fragments thereof, or have sequence similarity to a disclosed parental sequence, wherein the sequence similarity is at least 40%, preferably at least 60%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95%, most preferably 100%, and specifically bind a specifically disclosed presenilin or corresponding parental sequence pen-specific antibody, as measured in one or more of the disclosed interaction assays. The polypeptides comprise, and the similarity or identity extends over at least 10, preferably at least 15, more preferably at least 25, more preferably at least 35, more preferably at least 50 contiguous residues and most preferably over the entire polypeptide and/or parental pen sequence.

10 Table 1. Parental pen Polypeptides

| Parental pen | Natural Source | SEQ ID NO | % identity to human parental pen by BLAST |
|--------------|-----------------|----------------|---|
| pen-1 | C. elegans | (SEQ ID NO:1) | 28.7 |
| | D. melanogaster | (SEQ ID NO:2) | 45.4 |
| | H. Virescens | (SEQ ID NO:3) | 50 |
| | mouse | (SEQ ID NO:4) | 92.8 |
| | human | (SEQ ID NO:5) | 100 |
| pen-1B | human | (SEQ ID NO:6) | 51(identity to human parental pen-1) |
| pen-2 | C. elegans | (SEQ ID NO:7) | 42.6 |
| | D. melanogaster | (SEQ ID NO:8) | 60.4 |
| | rat | (SEQ ID NO:9) | 96 |
| | mouse | (SEQ ID NO:10) | 96 |
| | cow | (SEQ ID NO:11) | 95 |
| | human | (SEQ ID NO:12) | 100 |
| Aph-2 | C. elegans | (SEQ ID NO:13) | 18.9 |
| | D. melanogaster | (SEQ ID NO:14) | 29.9 |
| | human | (SEQ ID NO:15) | 100 |

15

WO 01/85912

PCT/US01/14648

For disclosed polymeric genes, "percent (%) sequence identity over a specified window size W" with respect to parental sequences is defined as the percentage of residues in any window of W residues in the candidate sequence that are identical with the residues in the parent sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. The % identity values are generated by

5 WU-BLAST-2.0a19 obtained from Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410(1990); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>. WU-BLAST-2.0a19 which uses several search parameters, all of which are set to the default values. The HSP S and HSP S2 parameters are dynamic values and are established by the program itself depending upon the composition of the particular sequence and composition of the particular database against which the sequence

10 of interest is being searched; however, the values may be adjusted to increase sensitivity. Hence, a % sequence identity value is determined by the number of matching identical residues divided by the window size W for which the percent identity is reported. Exemplary species are readily generated by mutating the corresponding parental sequences and confirming presenilin or antibody binding. For example, pen-1B polypeptides defined by

15 SEQ ID NOS:16-25 exemplify an active (demonstrating presenilin binding) 90% genus around parental sequence SEQ ID NO:6. In particular embodiments, the pen is a natural pen, such as human, mouse, *D. melanogaster*, *H. virescens* or *C. elegans* pen-1; human, rat, mouse, cow, *D. melanogaster* or *C. elegans* pen-2; human pen-1B, and human, *D. melanogaster* or *C. elegans* Aph-2. In a particular aspect, the pen is a naturally-occurring pen

20 identifiable in a sel-12A (Δ means deletion allele) homozygous *C. elegans* genetic mutation enhancer screen.

The interaction between the pen and Notch or APP processing may be detected in any convenient manner that specifically assays the pen influence on the processing pathway. The assay may be constructed to monitor a downstream perturbation in product generation (e.g.

25 A β or Notch intracellular domain production), an intermediate pathway step (a number of intermediate Notch and APP processing pathway steps and intermediate component interactions are well documented in the art), or initiating pen - presenilin or pen - γ -secretase binding.

A wide variety of systems may be used in the methods. Detailed below are animal

30 systems stressed with mutant pen genes to provide sensitized Notch and/or APP processing pathways, which systems are used to characterize additional interacting proteins. In particular embodiments, the system comprises a cell or animal expressing both the pen and a binding target such as a presenilin or γ -secretase, an in vitro, cell-free mixture comprising a determined amount of the pen and a binding target; applications of such cells and mixtures

35 include two-hybrid, biochemical pull-down, immunoprecipitation, fluorescent polarization and solid phase binding assays. In accordance with the diversity of applicable systems, a

WO 01/85912

PCT/US01/14648

wide variety of stresses may be assayed or evaluated, including chemical agents, such as candidate drugs, toxins, contaminants, etc.; radiation such as ultraviolet rays and x-rays; infection such as viral or bacterial infection including cellular transformation; genetic mutations, etc.

5 The particular method used to detect the interaction of the pen polypeptide and the presenilin will depend on the nature of the assay, so long as the interaction is specifically detected. For example, as detailed below, modulation of pen mutant specific phenotypes provide readouts for genetic interaction assays. For in vitro assays, depending on if and how the pen polypeptide and/or target are labeled, the interaction readout may be measured by changes in fluorescence, optical density, gel shifts, radiation, etc. In a particular embodiment, 10 the system provides a downstream APP processing readout.

In a particular embodiment, the methods involve specifically detecting a stress that alters a physical interaction of a subject pen polypeptide with APP and/or Notch processing. In one aspect, this embodiment comprises the steps of (a) introducing a predetermined stress into a system which provides a physical interaction of a pen with a binding target, whereby 15 the system provides a stress-biased interaction of the pen and the target, wherein the absence of the stress, the system provides an unbiased interaction of the pen polypeptide and the target; and (b) detecting the stress-biased interaction of the pen polypeptide and the target, wherein a difference between the stress-biased and unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen polypeptide and the target, wherein preferred targets 20 include γ -secretases, presenilins, notch and/or APP substrates, and/or combinations and complexes thereof.

In the latter embodiment, the presenilin is selected from a presenilin-1 (PS-1) and presenilin-2 (PS-2). These names are used generically to refer to polypeptides which comprise a disclosed parental sequence, comprises specified fragments thereof, or have 25 sequence similarity to the disclosed parental presenilin sequences, wherein the sequence similarity is at least 50%, more preferably at least 70%, more preferably at least 80%, more preferably at least 90%, more preferably at least 95% and most preferably 100%, wherein the presenilin is sufficient to provide a presenilin-specific, detectable functional interaction comparable to that provided by the corresponding parental sequence presenilin, as measured 30 in one or more of the disclosed genetic or biochemical interaction assays. The presenilins comprise, and the similarity or identity extends over at least 10, preferably at least 15, more preferably at least 25, more preferably at least 35, more preferably at least 50 contiguous residues and most preferably over the entire presenilin or parental sequence. The parental presenilin is selected from a natural sequence presenilin 1 (such as human, mouse, chicken

WO 01/85912

PCT/US01/14648

and xenopus sequences) and presenilin 2 (such as human, mouse and xenopus sequences), which are known in the art and accessible from public genetic depositories such as Genbank.

The compositions of the invention, useful in the subject methods, include the subject pen polypeptides and mixtures comprising predetermined amounts of a disclosed pen and presenilin polypeptides, particularly wherein one, preferably both of these components are isolated and mixtures consisting essentially of both components, i.e. wherein other components of the mixture (except for an assayed stress) do not significantly influence the interaction of these two components. Other aspects of the invention include nucleic acids encoding the disclosed pen polypeptides, antibodies which specifically bind them, and methods of use.

Subject polypeptides consisting of the disclosed parental sequences or fragments thereof are isolated, i.e. encompass pen polypeptides covalently joined to a non-natural or heterologous component, such as a non-natural amino acid or amino acid sequence or a natural amino acid or sequence other than that which the polypeptide is joined to in a natural protein, are preferably in solution, and preferably constitute at least about 0.5%, and more preferably at least about 5% by weight of the total polypeptide in a given sample and pure polypeptides constitute at least about 90%, and preferably at least about 99% by weight of the total polypeptide in a given sample, as are preferred subject polypeptides comprising other than parental sequence. The polypeptides may be covalently or noncovalently part of a larger complex, such as larger polypeptides and/or various conjugates, etc. The polypeptides may be synthesized, produced by recombinant technology, or purified from mammalian, preferably human cells. A wide variety of molecular and biochemical methods are available for biochemical synthesis, molecular expression and purification of the subject compositions, see e.g. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Sambrook, *et al.* Cold Spring Harbor Laboratory), Current Protocols in Molecular Biology (Eds. Ausubel, *et al.*, Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) or that are otherwise known in the art.

The pen encompassing fragments comprise at least 10, preferably at least 15, more preferably at least 25, more preferably at least 35, most preferably at least 50 consecutive residues of a corresponding disclosed parental pen sequence. Pen polypeptides provide corresponding pen specific function, such as interacting with a component of a natural notch or APP processing pathway, especially presenilin binding or binding inhibitory activity as shown in one or more binding assays as described herein, and/or pen specific antibody binding or binding inhibitory activity, particularly as measured in a disclosed binding assay.

Pen-specific function may be determined by convenient *in vitro*, cell-based, or *in vivo* assays, e.g. binding assays. The term binding assay is used generically to encompass any assay, including *in vitro*, cell-culture or animal-based assays (e.g. using gene therapy

WO 01/85912

PCT/US01/14648

techniques or with transgenics), etc. where the molecular interaction of a pen polypeptide with a specific binding target is evaluated. The binding target may be a natural intracellular binding target such as a presenilin, a pen regulating protein or other regulator that directly modulates pen activity or its localization; or non-natural binding target such as a specific immune protein such as an antibody, or a pen specific agent such as those identified in screening assays such as described below. Pen-binding specificity may be assayed by APP processing (e.g. ability of the subject polypeptides to function as negative effectors in pen-expressing cells), by binding equilibrium constants (usually at least about $10^7 M^{-1}$, preferably at least about $10^8 M^{-1}$, more preferably at least about $10^9 M^{-1}$), by immunogenicity (e.g. ability to elicit pen specific antibody in a heterologous host such as a mouse, rat, goat or rabbit), etc.

In a particular embodiment, the subject polypeptides provide pen-specific antigens and/or immunogens, especially when coupled to carrier proteins. For example, the subject polypeptides are covalently coupled to keyhole limpet antigen (KLH) and the conjugate is emulsified in Freund's complete adjuvant. Laboratory rabbits are immunized according to conventional protocol and bled. The presence of pen-specific antibodies is assayed by solid phase immunosorbent assays using immobilized corresponding pen polypeptides, see, e.g. Table 2.

Table 2. Immunogenic pen-1B polypeptides eliciting pen-1B-specific rabbit polyclonal antibody: pen-1B polypeptide-KLH conjugates immunized per protocol described above.

| pen-1B Polypeptide Sequence | Immuno- genicity | pen-1B Polypeptide Sequence | Immuno- genicity |
|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
| SEQ ID NO:6, res 1-14 | +++ | SEQ ID NO:6, res 115-126 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 6-15 | +++ | SEQ ID NO:6, res 130-140 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 10-20 | +++ | SEQ ID NO:6, res 139-151 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 25-46 | +++ | SEQ ID NO:6, res 166-182 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 62-71 | +++ | SEQ ID NO:6, res 184-198 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 67-76 | +++ | SEQ ID NO:6, res 214-232 | +++ |
| SEQ ID NO:6, res 72-95 | +++ | SEQ ID NO:6, res 246-257 | +++ |

The subject pen polypeptides also encompass minor deletion mutants, including N-, and/or C-terminal truncations, of the parental pen polypeptides. Such deletion mutants are readily screened for pen competitive or dominant negative activity. Exemplary active

WO 01/85912

PCT/US01/14648

deletion mutants for pen-1B include polypeptides comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:6, residues 1-254; SEQ ID NO:6, residues 4-255; SEQ ID NO:6, residues 9-257; and SEQ ID NO:6, residues 2-255.

5 The invention provides binding agents specific to the claimed pen-1B polypeptides, including natural intracellular binding targets, etc., methods of identifying and making such agents, and their use in diagnosis, therapy and pharmaceutical development. For example, specific binding agents are useful in a variety of diagnostic and therapeutic applications, especially where disease or disease prognosis is associated with unoptimized utilization of a pathway involving pen, e.g. APP processing. Novel pen-specific binding agents include pen-specific receptors, such as somatically recombined polypeptide receptors like specific antibodies or T-cell antigen receptors (see, e.g. Harlow and Lane (1988) *Antibodies*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory) and other natural intracellular binding agents identified with assays such as one-, two- and three-hybrid screens, non-natural intracellular binding agents identified in screens of chemical libraries such as in vitro, cell-based and animal-based binding assays described herein, or otherwise known to those of skill in the art, etc. Agents of particular interest modulate pen function, e.g. pen-dependent Notch or APP processing, and include dominant negative deletion mutants, etc. Accordingly, the invention also provides methods for modulating APP processing in a cell comprising the step of modulating pen activity, e.g. by contacting the cell with a modulator of a resident pen, a dominant negative pen deletion mutant, or pen polynucleotide (below).

20 In addition to direct synthesis, the subject polypeptides can also be expressed in cell and cell-free systems (e.g. Jermutus L, et al., *Curr Opin Biotechnol.* 1998 Oct;9(5):534-48) from encoding polynucleotides, such as the corresponding parent polynucleotides or naturally-encoding polynucleotides isolated with degenerate oligonucleotide primers and probes generated from the subject polypeptide sequences ("GCG" software, Genetics Computer Group, Inc, Madison WI) or polynucleotides optimized for selected expression systems made by back-translating the subject polypeptides according to computer algorithms (e.g. Holler et al. (1993) *Gene* 136, 323-328; Martin et al. (1995) *Gene* 154, 150-166). Hence, the polypeptides may be synthesized, produced by recombinant technology, or purified from cells. A wide variety of molecular and biochemical methods are available for biochemical synthesis, molecular expression and purification of the subject compositions, see e.g. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Sambrook, et al. Cold Spring Harbor Laboratory), *Current Protocols in Molecular Biology* (Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY) or that are otherwise known in the art.

30 The invention provides polynucleotides encoding the disclosed polypeptides, and pen-gene specific polynucleotides, which polynucleotides may be joined to other components

WO 01/85912

PCT/US01/14648

such as labels or other polynucleotide sequences (i.e. they may be part of larger sequences) and are of synthetic/non-natural sequences and/or are isolated, i.e. unaccompanied by at least some of the material with which it is associated in its natural state, preferably constituting at least about 0.5%, preferably at least about 5% by weight of total nucleic acid present in a given fraction, and usually recombinant, meaning they comprise a non-natural sequence or a natural sequence joined to nucleotide(s) other than that which it is joined to on a natural chromosome. Recombinant polynucleotides comprising natural sequence contain such sequence at a terminus, immediately flanked by (i.e. contiguous with) a sequence other than that which it is joined to on a natural chromosome, or flanked by a native flanking region fewer than 10 kb, preferably fewer than 2 kb, more preferably fewer than 500 bases, most preferably fewer than 100 bases, which is at a terminus or is immediately flanked by a sequence other than that which it is joined to on a natural chromosome. While the polynucleotides are usually RNA or DNA, it is often advantageous to use polynucleotides comprising other bases or nucleotide analogs to provide modified stability, etc. Furthermore, the terms polynucleotide and nucleic acid are used interchangeably to refer to any polymer of nucleotides, without restriction by length.

The invention also encompasses pen, particularly pen-1B gene specific polynucleotides. For example, the nucleotide sequence of a natural human transcript encoding a natural human pen-1B polypeptide is shown as SEQ ID NO:26. The term pen-1B gene specific polynucleotides is used generically to refer to polynucleotides comprising SEQ ID NO:26, comprising specified fragments of SEQ ID NO:26, or having sequence similarity to SEQ ID NO:26. Subject fragments of SEQ ID NO:26, which are useful, e.g. as hybridization probes and replication / amplification primers, comprise at least 12, preferably at least 24, more preferably at least 48, more preferably at least 96 and most preferably at least 182 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:26.

Pen gene specific polynucleotides effect specific hybridization to the corresponding parental sequence or complement thereof; for example, all pen-1B gene specific polynucleotides effect specific hybridization to SEQ ID NO:26 or its complement. Demonstrating specific hybridization generally requires stringent conditions, for example, hybridizing in a buffer comprising 30% formamide in 5 x SSPE (0.18 M NaCl, 0.01 M NaPO₄, pH 7.7, 0.001 M EDTA) buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE; preferably hybridizing in a buffer comprising 50% formamide in 5 x SSPE buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE buffer at 42°C. Specifically hybridizing polynucleotides are readily identified in convenient gel-based assays; for example, polynucleotides comprising SEQ ID NOS:27-38 are shown to specifically hybridize with SEQ ID NO:26 under the foregoing preferred hybridization conditions.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Table 3. Exemplary pen-1B gene specific polynucleotides which hybridize with a strand of SEQ ID NO:26 under Conditions I and II.

| | <u>pen-1B gene specific</u> <u>polynucleotides</u> | <u>Specific</u> <u>Hybrids</u> | <u>pen-1B gene specific</u> <u>polynucleotides</u> | <u>Specific</u> <u>Hybrids</u> |
|----|---|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| | SEQ ID NO:26, nucl 1-36 | + | SEQ ID NO:27 | + |
| 5 | SEQ ID NO:26, nucl 32-68 | + | SEQ ID NO:28 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 65-97 | + | SEQ ID NO:28 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 103-140 | + | SEQ ID NO:30 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 131-154 | + | SEQ ID NO:31 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 148-182 | + | SEQ ID NO:32 | + |
| 10 | SEQ ID NO:26, nucl 222-256 | + | SEQ ID NO:33 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 258-286 | + | SEQ ID NO:34 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 273-305 | + | SEQ ID NO:35 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 318-352 | + | SEQ ID NO:36 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 344-376 | + | SEQ ID NO:37 | + |
| 15 | SEQ ID NO:26, nucl 352-386 | + | SEQ ID NO:38 | + |
| | SEQ ID NO:26, nucl 388-424 | + | | |
| | SEQ ID NO:26, nucl 406-431 | + | | |
| | SEQ ID NO:26, nucl 420-446 | + | | |

20 The subject nucleic acids find a wide variety of applications including use as
translatable transcripts, hybridization probes, PCR primers, diagnostic nucleic acids, etc.; use
in detecting the presence of other pen gene specific polynucleotides and gene transcripts and
in detecting or amplifying nucleic acids encoding additional pen homologs and structural
analogs. For example, pen-encoding polynucleotides may be used in pen-expression vectors,
25 generally operably linked to a heterologous promoter, and/or incorporated into recombinant
host cells, e.g. for expression and screening, transgenic animals, e.g. for functional studies
such as the efficacy of candidate drugs for disease associated with pen-modulated cell
function, etc. In diagnosis, pen hybridization probes find use in identifying wild-type and
mutant pen alleles in clinical and laboratory samples. Mutant alleles are used to generate
30 allele-specific probes for high-throughput clinical diagnoses, e.g. for pen mutations associated

WO 01/85912

PCT/US01/14648

with Alzheimer's disease. In therapy, therapeutic pen polynucleotides are used to modulate cellular expression or intracellular concentration or availability of active pen.

For example, pen polynucleotides are used to modulate cellular expression or intracellular concentration or availability of active pen protein. Pen inhibitory nucleic acids are typically antisense: single-stranded sequences comprising complements of the disclosed natural pen transcript sequence. Antisense modulation of the expression of a given pen polypeptide may employ antisense nucleic acids operably linked to gene regulatory sequences. Cells are transfected with a vector comprising a pen gene specific polynucleotide sequence with a promoter sequence oriented such that transcription of the gene yields an antisense transcript capable of binding to endogenous pen encoding mRNA. Alternatively, single-stranded antisense polynucleotides that bind to genomic DNA or mRNA encoding pen polypeptide may be administered to the target cell, in or temporarily isolated from a host, at a concentration that results in a substantial reduction in expression of the targeted protein. An enhancement in pen expression is effected by introducing into the targeted cell type pen polynucleotides that increase the functional expression of the corresponding gene products. Such polynucleotides may be pen expression vectors, vectors that upregulate the functional expression of an endogenous allele, or replacement vectors for targeted modification of endogenous mutant or wild type alleles. Techniques for introducing the nucleic acids into viable cells are known in the art and include retroviral-based transfection, viral coat protein-liposome mediated transfection, etc.

The invention provides efficient methods of identifying agents, compounds or lead compounds for agents active at the level of a pen modulatable cellular function and/or pen gene expression, including transcription. A wide variety of assays for transcriptional modulators or binding agents is provided including labeled *in vitro* ligand binding assays, immunoassays, etc. The methods are amenable to automated, cost-effective high throughput screening of chemical libraries for lead compounds. Identified reagents find use in the pharmaceutical industries for animal and human trials; for example, the reagents may be derivatized and rescreened in *in vitro* and *in vivo* assays to optimize activity and minimize toxicity for pharmaceutical development.

A wide variety of assays for binding agents, i.e. screens for compounds that modulate pen interaction with a natural pen binding target are also provided. These assays employ a mixture of components including a pen polypeptide, which may be part of a fusion product with another polypeptide, e.g. a peptide tag for detection or anchoring, etc. The assay mixtures comprise a natural intracellular pen binding target. In a particular embodiment, the binding target is presenilin, or portion thereof which provides binding affinity and avidity to the subject pen polypeptide conveniently measurable in the assay and preferably comparable

WO 01/85912

PCT/US01/14648

to the intact presenilin. The assay mixture also comprises a candidate pharmacological agent. Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic compounds; preferably small organic compounds and are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. A variety of other reagents may also be included in the mixture. These include reagents like salts, buffers, neutral proteins, e.g. albumin, detergents, protease inhibitors, nuclease inhibitors, antimicrobial agents, etc.

The resultant mixture is incubated under conditions whereby, but for the presence of the candidate pharmacological agent, the pen polypeptide specifically binds the cellular binding target, portion or analog with a reference binding affinity. The mixture components can be added in any order that provides for the requisite bindings, and incubations may be performed at any temperature which facilitates optimal binding. Incubation periods are likewise selected for optimal binding but also minimized to facilitate rapid, high-throughput screening.

After incubation, the agent-biased binding between the pen polypeptide and one or more binding targets is detected by any convenient way. A variety of methods may be used to detect the change depending on the nature of the product and other assay components, e.g. through optical or electron density, radiative emissions, nonradiative energy transfers, etc. or indirect detection with antibody conjugates, etc. A difference in the binding affinity of the pen-1B to the target in the absence of the agent as compared with the binding affinity in the presence of the agent indicates that the agent modulates the binding of the pen to the binding target. A difference, as used herein, is statistically significant and preferably represents at least a 50%, more preferably at least a 90% difference.

The following experimental section and examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXAMPLES, PROTOCOLS AND EXPERIMENTAL PROCEDURES

I. High-Throughput In Vitro Fluorescence Polarization Assay

Reagents:

pen peptide (size minimized, rhodamine-labeled; final conc. = 1 - 5 nM)

PS polypeptide (final conc. = 100 - 200 nM)

Buffer: 10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 6 mM magnesium chloride, pH 7.6

Protocol:

WO 01/85912

PCT/US01/14648

1. Add 90 microliters of pen peptide/PS polypeptide mixture to each well of a 96-well microtiter plate.
2. Add 10 microliters of test compound per well.
3. Shake 5 min and within 5 minutes determine amount of fluorescence polarization by using a Fluorolite FPM-2 Fluorescence Polarization Microtiter System (Dymatech Laboratories, Inc).

II. Conformational Sensor - ELISA Format Assay

Buffer and Solution Preparation:

1. 10X Assay Buffer:
 - 100mL of 1M Hepes
 - 300mL of 5M NaCl
 - 20mL of 1M MgCl
 - Add MQ H₂O to 1L
2. Master Mix of peptide / protein
 - Protein: Glutathione-S-transferase/ γ -secretase polypeptide fusion protein: final conc = 100 nM
 - pen peptide (size minimized, biotinylated; final conc. = 1 μ M)
 - Add Assay Buffer and H₂O to bring to final volume: final buffer conc = 1X
3. Antibody Mix:
 - anti-GST, rabbit (final conc. = 1:10,000)
 - anti-rabbit-HRP (final conc. = 1:10,000)
 - Add T-TBS to bring to final volume: final buffer conc = 1X

Procedure:

1. Make 50 mL of Master Mix (see 2 above) of appropriate peptide / protein combinations (use 50 mL polypropylene tubes). Incubate for 1 hr at RT
2. Add 95 μ L of Master Mix to each well of a 96-well plate**
 - ** Reacti-Bind Streptavidin-Coated, White Polystyrene Plates (#15118B), which have been blocked by Super-Blocking Reagent from Pierce.
3. Transfer 5 μ L of each test compound (stock = 60 μ M) to each well of the plate
4. Incubate plate for 1hr at RT

WO 01/85912

PCT/US01/14648

5. While incubating, make rabbit anti-GST antibody and anti-rabbit-HRP Antibody Mix (see 3 above). Incubate on ice for 1 hr.
 6. Wash plates 3X with H₂O thoroughly
 7. Add 100 μ L of Antibody Mix into each well of the plate
 8. Incubate for 1 hr at RT
 - 5 9. Wash 3X with H₂O
 10. Dilute Supersignal substrate (mixed Luminol and peroxide) in 1:2 H₂O and then add 100 μ L into each well
 11. Shake 3-5 min. Read chemiluminescence.
- 10 III. High-Throughput In Vitro Binding Assay.
- A. Reagents:
- Neutralite Avidin: 20 μ g/ml in PBS.
 - Blocking buffer: 5% BSA, 0.5% Tween 20 in PBS; 1 hour at room temperature.
 - Assay Buffer: 100 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7.6, 1 mM MgCl₂, 1% glycerol,
 - 15 0.5% NP-40, 50 mM b-mercaptoethanol, 1 mg/ml BSA, cocktail of protease inhibitors.
 - ³²P pen peptide 10x stock: 10⁻⁸ - 10⁻⁶M "cold" pen peptide supplemented with 200,000-250,000 cpm of labeled pen peptide (Beckman counter). Place in the 4°C microfridge during screening.
 - Protease inhibitor cocktail (1000X): 10 mg Trypsin Inhibitor (BMB # 109894), 10
 - 20 mg Aprotinin (BMB # 236624), 25 mg Benzamidine (Sigma # B-6506), 25 mg Leupeptin (BMB # 1017128), 10 mg APMSF (BMB # 917575), and 2mM NaVO₃ (Sigma # S-6508) in 10 ml of PBS.
 - Binding Polypeptide: 10⁻⁷ - 10⁻⁵ M biotinylated PS polypeptide in PBS.
- B. Preparation of assay plates:
- 25 - Coat with 120 μ l of stock N-Avidin per well overnight at 4°C.
 - Wash 2 times with 200 μ l PBS.
 - Block with 150 μ l of blocking buffer.
 - Wash 2 times with 200 μ l PBS.
- C. Assay:
- 30 - Add 40 μ l assay buffer/well.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

- Add 10 μ l compound or extract.
- Add 10 μ l 32 P-pen peptide (20-25,000 cpm/0.1-10 pmoles/well $\approx 10^9$ - 10^7 M final conc).
- Shake at 25°C for 15 minutes.
- Incubate additional 45 minutes at 25°C.
- 5 - Add 40 μ M biotinylated PS polypeptide (0.1-10 pmoles/40 μ l in assay buffer)
- Incubate 1 hour at room temperature.
- Stop the reaction by washing 4 times with 200 μ M PBS.
- Add 150 μ M scintillation cocktail.
- Count in Topcount.
- 10 D. Controls for all assays (located on each plate):
 - a. Non-specific binding
 - b. Soluble (non-biotinylated PS polypeptide) at 80% inhibition.

IV. Identification of presenilin enhancer genes: natural pen-1 and pen-2.

- 15 The partial redundancy of sel-12 and hop-1 means that, for most tissues, a deletion of one or the other gene will result in only a partial loss of presenilin function. Hence, a knock-out mutation in one or the other gene provides a sensitized background for genetic screens designed to identify presenilin interacting genes. Using this reasoning, we designed several variations of genetic screens aimed at identifying genes that act in concert with
- 20 presenilins. One variation (Screen A) is to mutagenize worms homozygous for a sel-12 deletion mutation (hereinafter referred to as sel-12 Δ) and screen for enhancer mutations that, in combination with sel-12 Δ , produce phenotypes equivalent to those of the sel-12 Δ ; hop-1 Δ double mutant. Such enhancer mutations identify both 1) components that interact uniquely with hop-1 presenilin and 2) components that interact with both hop-1 and sel-12 presenilins.
- 25 As an internal control, Screen A is expected to yield loss-of-function hop-1 alleles since the screen targets the phenotypes seen in the sel-12 Δ ; hop-1 Δ double mutant. Another variation is to mutagenize a hop-1 single mutant and again screen for enhancement to the phenotypes associated with a complete presenilin.

- 30 In addition to the desired mutations that enhance presenilin defects, these screens identify mutations in known components of the glp-1 signaling pathway (e.g., glp-1/Notch receptor, lag-2/DSL ligand, lag-2/Su(H) family effector) since loss of these gene products results in glp-1 like sterility. An important distinction between presenilin enhancers and

WO 01/85912

PCT/US01/14648

mutations in known *glp-1* pathway genes is that former result in *glp-1*-like sterility only in a *sel-12Δ* background whereas the latter result in *glp-1* sterility in both a wild-type genetic background (Austin, J. and Kimble, J., *Cell* (1987) 51:589-599; Lambie, E. and Kimble, J., *Development* 1991) 112:231-240) and a *sel-12Δ* background.

5 We performed Screen A on a large scale, screening approximately 128,000 haploid genomes after mutagenesis of a *sel-12Δ* homozygous strain with ethyl methane sulfonate. The screen resulted in the isolation of the expected types of mutants, including 27 putative *glp-1* alleles, 3 mutations identified as likely *lag-1* or *lag-2* alleles based on map position, and 8 *hop-1* mutations. As expected, the putative *glp-1*, *lag-1*, and *lag-2* mutations result in *glp-1*-like sterility in both a wild type and a *sel-12Δ* genetic background; these mutations 10 therefore cause sterility independently of the presence or absence *sel-12+* function. By contrast, the 8 *hop-1* mutations result in a penetrant *glp-1*-like sterile phenotype in the absence, but not the presence, of *sel-12+* activity.

In addition to the preceding, we isolated 7 mutants that, based on mapping and 15 complementation tests, identify two new presenilin-interacting genes. Four of these mutants identify the gene *pen-1* located on chromosome I and other three identify the gene *pen-2* located on chromosome III. Our subsequent work with these genes indicated: 1) that the *pen-1* and *pen-2* enhancers alleles are loss-of-function mutations; 2) that loss of *pen-1+* or *pen-2+* function, in combination with a loss of *sel-12+* function, has the same phenotypic consequences as a complete loss of presenilin function; 3) that loss of *pen-1+* and *pen-2+* 20 function in a *sel-12+* background results in phenotypes indicative of a partial loss of presenilin/Notch pathway function; 4) that *pen-1* and *pen-2* interact genetically with both *sel-12* and *hop-1*; 5) that the open reading frames for *pen-1* and *pen-2* encode unrelated integral membrane proteins; 6) that *pen-1* and *pen-2* related genes are conserved across phyla.

25 *Pen-1* and *pen-2* mutations enhance *sel-12Δ* to the *lin-12/glp-1*-like phenotypes associated with total presenilin loss. As double mutants with a *sel-12Δ* mutation, *pen-1* alleles and *pen-2* alleles each result in a set of phenotypes identical with those seen in *sel-12Δ*; *hop-1Δ* worms that receive no maternal *sel-12+* activity. Specifically, each of these double mutants with *sel-12Δ* share 3 common abnormalities that are not seen in *sel-12Δ* or *hop-1Δ* single mutants, or in *pen-1* or *pen-2* single mutants. First, all three sets of double 30 mutants display indistinguishable *glp-1*-like sterile phenotypes characterized by germ cell proliferation defect similar to that described for *glp-1* loss-of-function mutants (Austin and Kimble, 1987). Second, all three double mutants show a common cell fate specification defect(s) that indicates a loss of *lin-12/Notch* signaling. *lin-12+* activity is required for the ventral uterine precursor versus anchor cell fate decision: *lin-12(lf)* mutants have 2 anchor 35 cells rather than the normal complement of one because the cell that normally adopts the

WO 01/85912

PCT/US01/14648

ventral uterine precursor fate instead becomes an anchor cell (Greenwald, I. et al., *Cell* (1983) 34:435-444). The *sel-12Δ*; *pen-1* and *sel-12Δ*; *pen-2* double mutants display this "2 anchor cell" phenotype just as does the *sel-1Δ2*; *hop-1Δ* double mutant (Westlund, B et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1999) 96: 2497-2502). Third, *sel-12Δ*; *pen-1* and *sel-12Δ*; *pen-2* double mutants, like *sel-12Δ*; *hop-1Δ*, display an everted vulva phenotype that is reminiscent of vulva defects seen in *lin-12(lf)* mutants.

The above phenotypic comparisons demonstrate that a reduction in *pen-1+* or *pen-2+* activity, in combination with a loss of *sel-12+* activity, results in a loss of presenilin pathway function comparable to the effects of eliminating the two redundant presenilins encoded by *sel-12* and *hop-1*.

Single *pen-1* and *pen-2* mutations confer phenotypes associated with partial loss of presenilin function. As single mutants, *pen-1* and *pen-2* worms display two visible abnormalities. First, *pen-1* and *pen-2* homozygotes (produced from a *pen-1/+* or *pen-2/+* mother) both produce normal numbers of self-progeny embryos but these embryos are retained in the animal's uterus and never laid. *pen-1* and *pen-2* hermaphrodites are thus egg-laying defective (or *Egl*), a phenotype shared by the *sel-12Δ* single mutant.

Second, the embryos produced by homozygous *pen-1* or *pen-2* hermaphrodites never hatch but instead arrest in development with multiple abnormalities. The arrested embryos produced by *pen-1* and *pen-2* hermaphrodites show very similar abnormalities. Most strikingly, many of the arrested embryos make only a partial pharynx: the posterior pharyngeal lobe is present, but the anterior lobe is absent. Absence of anterior pharynx, called an *Aph* phenotype (for no anterior pharynx), was first described for certain weak alleles of *glp-1*. The *GLP-1* receptor is required for a specific embryonic signaling event that induces formation of anterior pharynx (Mello, C. et al., *Cell* (1994) 77: 95-106; Moscovitz, I et al., *Development* (1994) 120:3325-3338; Hutter, H. and Schnabel, R., *Development* (1994) 120:2051-2064); absence of maternally provided *glp-1+* activity can thus result in the *Aph* phenotype as well as other defects (Priess, J. et al., *Cell* (1987) 5:601-611). A connection of the *Aph* phenotype with reduced presenilin function comes from analysis of *sel-12Δ*; *hop-1Δ* hermaphrodites which receive maternal *sel-12+* (which rescues the sterility seen in the absence of maternal *sel-12+* function). In this situation, *sel-12Δ*; *hop-1Δ* hermaphrodites produce arrested embryos which display the *Aph* phenotype, as well addition to other *glp-1* like embryonic defects (Westlund, B., *supra*). These properties of *pen-1* and *pen-2* indicate both genes act in concert with both *sel-12* and *hop-1* presenilins, since the loss of *pen-1* or *pen-2* causes phenotypes more severe than those cause by the *sel-12* or *hop-1* single mutant.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

In addition to the Aph phenotype, embryos produced by homozygous pen-1 or pen-2 hermaphrodites display other abnormalities. The embryos usually arrest with little evidence of elongation and the embryonic hypodermis (layer of epidermal cells that lies under and secretes the cuticle) often fails to fully enclose other cell types. Similar phenotypes have been described for embryos produced by glp-1(ts) mutants.

5 In summary, pen-1 and pen-2 mutants share multiple phenotypes (Egl, Aph and defective embryonic elongation) that are indicative of cell signaling defects involving the Notch family receptors glp-1 and lin-12. In addition, in combination with sel-12Δ, pen-1 and pen-2 result in additional, stronger Notch pathway-related defects (glp-1-like sterility, 2 anchor cell phenotype; vulva eversion). The combined genetic and phenotypic evidence 10 indicates that pen-1 and pen-2 are novel components that may assist presenilins in Notch receptor maturation and/or processing.

Pen-1 corresponds to the predicted *C. elegans* gene VF36H2L.1. To clone pen-1, we genetically mapped pen-1(ep140) to increasingly smaller intervals, first using visible genetic markers and then using molecular markers [Tc1 transposon insertions and single nucleotide 15 polymorphisms (SNPs)]. The final stage of SNP mapping of pen-1 narrowed its position to a 52 KB interval on chromosome I. This interval, as documented in the *C. elegans* database ACEDB (Eeckman, F. and Durbin, R. *C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism* (1995) pp. 583-599), contains a total of 7 predicted genes. One of these, VF36H2L.1, was identified as pen-1 on the basis of RNA-mediated interference (RNAi) data 20 and mutation detection. For many *C. elegans* genes, RNAi disrupts both maternal and zygotic gene activity (Tabara, H. et al. *Science* (1998) 282:430-431). In case of pen-1, disruption of maternal activity after injection of dsRNA into adult hermaphrodites was evidenced by the production of developmentally arrested embryos with an Aph phenotype. As expected, this phenotype was observed after RNAi of both wild-type and sel-12Δ 25 hermaphrodites. RNAi in either background also gave many viable escaper progeny that grew to adulthood. In the case of RNAi in a sel-12Δ background, a high proportion of these escapers displayed glp-1-like sterility, consistent with inhibition of zygotic pen-1 activity. Unexpectedly, RNAi of VF36H2L.1 in wild type also resulted in Glp sterile progeny, although at a much lower frequency than in with pen-1 RNAi in a sel-12Δ homozygotes. By 30 contrast, glp-1-like sterility is never observed in pen-1 single mutants. This difference is most likely attributable to the property that RNAi typically disrupts both maternal and zygotic gene function, and can therefore result in more severe phenotypes than seen in zygotically lethal mutations.

By sequence analysis, we determined that the four pen-1 alleles isolated as sel-12 35 enhancers each contain single-nucleotide substitutions in the VF36H2L.1 open reading frame.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Remarkably, these 4 independently-derived lesions are each nonsense mutations in the same codon, Trp191. Three alleles (ep140, ep168, and ep170) are third base UGG to UGA alterations, while the fourth (ep216) is a second base UAG to UGG change. That these lesions result in Aph and glp-1 like sterility phenotypes similar to RNAi of VF36H2L.1, indicates that they are reduction-of-function mutations.

5 Pen-1 encodes an evolutionarily conserved protein with multiple transmembrane domains. The pen-1 (VF36H2L.1, GI#2815036) open reading frame is split among 4 exons that, when spliced, encode a 308 amino-acid protein. We confirmed the predicted splice junctions of exons 2 and 3 by sequence analysis of partial cDNA product. Pen-1 shows homology with the predicted structures of various human, mouse, and Drosophila proteins, as described in detail below. Pen-1 is a predicted integral membrane protein that, as determined
10 by the structure predicting programs PSORT2 and TopPred2, may contain up to 7 membrane-spanning domains.

Pen-2 corresponds to predicted *C. elegans* gene T28D6.9. We genetically mapped pen-2 to chromosome III between the cloned genes pha-1 and dpy-18. This interval spans approximately 240 KB of DNA and contains 31 predicted genes as documented in ACEDB ver. 9 (Eeckman, F. and Durbin, R., *C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism* (1995) pp. 583-599). pen-2 was identified as the predicted gene T28D6.9 on the basis of RNAi data and mutation detection. RNAi of most of the genes in the interval led to the identification of, T28D6.9, as the only candidate gene for which RNAi gave the expected
20 maternal and zygotic pen-2 phenotypes. Wild type and sel-12Δ hermaphrodites injected with T28D6.9 produced a high proportion of developmentally-arrested embryos, many of which were Aph. In addition, RNAi of sel-12Δ (but not wild type) worms resulted in viable "escaper" progeny that displayed glp-1 like sterility. Mutation detection for the three pen-2 alleles isolated as sel-12 enhancers revealed that each contains a nonsense mutation in the T28D6.9 predicted open reading frame. Two lesions (ep219 and ep220) alter the Trp74 codon, changing it from UGG to UGA (ep219) or UAG (ep220), while the third lesion (ep221) changes Trp36 to a UGA stop codon. These nonsense alleles should strongly reduce or abolish gene function, indicating that enhancement of sel-12Δ results from a loss of wild-type pen-2+ activity.

30 Pen-2 encodes a predicted multi-pass membrane protein. The pen-2 (T28D6.9, GI#3873415) open reading frame encodes a 101 amino acid protein. The predicted exon/intron structure of pen-2 has been confirmed by the sequence of an unpublished full-length cDNA (yk569h5 GI# 5572325 and 5558557) present in Genbank. Pen-2 shows a high level of homology with the predicted structures of various human, mouse, rat, and
35 Drosophila proteins, as described in detail below. Pen-2 is a predicted integral membrane

WO 01/85912

PCT/US01/14648

protein that, as determined by the structure predicting programs PSORT2 and TopPred2, contains 2 likely transmembrane domains.

Based on several properties, including their own specific phenotypes and their interactions with sel-12, pen-1 and pen-2 likely encode products that interact with presenilins. By extension, other genes with properties in common with pen-1, pen-2, sel-12, or hop-1 can be considered as potential presenilin interacting genes. We have identified the aph-2 gene as a presenilin interacting gene based on 1) the specific phenotypes associated with a loss of aph-2+ function and 2) our identification of novel genetic interactions of aph-2 and with sel-12 and hop-1, and with pen-1 and pen-2.

The aph-2 gene was identified by C. Goutte et al. (1995 International Worm Meeting, abstract 39; 1998 East Coast Worm Meeting, abstract 151; Worm Breeder's Gazette 12(5):27 (1993); Worm Breeder Gazette 13(d):83 (1994)) as a possible component of glp-1 mediated signaling in *C. elegans* embryos. The aph-2 mutants characterized by these investigators have no reported zygotic phenotypes, but do have maternal embryonic defects, including an Aph phenotype, strikingly similar to glp-1(ts) embryonic defects. aph-2 reportedly corresponds to the predicted gene ZC434.6. The predicted aph-2 protein is a 721 amino acids in length and is characterized by a signal sequence and 1 to 3 transmembrane domains as predicted by PSORT2 (Nakai K., and Horton P., Trends Biochem Sci, 1999, 24:34-6) and TopPred2 (Claros MG, and von Heijne G. Comput Appl Biosci 1994 Dec;10(6):685-6).

The screen that identified pen-1 and pen-2 did not yield mutations in aph-2. In order to identify potential presenilin/ aph-2 interactions that may have been missed due to the high stringency of this screen, we investigated a variety of genetic backgrounds that are more highly sensitized for presenilin loss. For these experiments, due to the lack of an available aph-2 mutations, we used RNAi to reduce aph-2+ function in selected backgrounds. Injection of aph-2 dsRNA into the germ line of wild type hermaphrodites results in highly penetrant embryonic lethality among the progeny, with many of the arrested embryos displaying an Aph phenotype. However, injected hermaphrodites still produce a substantial fraction of viable progeny that grow to adulthood with no phenotypic abnormalities in somatic tissues. These worms can be considered "transient escapers" because many of them produce developmentally-arrested Aph embryos. We were thus able to inject adult hermaphrodites with aph-2 RNA and examine their transient escaper progeny for presenilin-dependent phenotypes. Table 4 summarizes the results of these experiments.

Table 4 Enhancement of presenilin and pen gene phenotypes by aph-2 RNAi (transgene escaper progeny phenotypes).

WO 01/85912

PCT/US01/14648

| Genotype1 | Zygotic Phenotypes (no aph-2 RNAi) | Zygotic phenotypes after aph-2 RNAi 2 |
|-------------------------|--|--|
| wild type | wild-type | wild-type |
| sel-12Δ | Egg-laying defective | Egg-laying defective |
| sel-12Δ; hop-1(ep168)/+ | Egg-laying defective | glp-1 like sterility (12%) |
| hop-1(ep171)3 | Low penetrance glp-1 like sterility (<1%) | glp-1 like sterility (>50%) |
| 5 pen-1(ep140) | Egg-laying defective | glp-1 like sterility (>50%) |
| pen-2(ep220) | Egg-laying defective | glp-1 like sterility (>50%) |

1 Complete genotypes of XX hermaphrodites were as follows: Row 1: N2 (wild-type). Row 2:

10 sel-12(ep6). Row 3: sel-12(ep6); hop-1(ep168) unc-74(x19) hT2 [hop-1+ unc-74+]. Row 4: hop-1(ep171) unc-74(x19). Row 5: unc-29(e1072) pen-1(ep140) Row 6: pen-2(ep220) dpy-18(e364).

15 2 Hermaphrodites from homozygous or heterozygous stocks were injected with aph-2 dsRNA.

All genotypes segregated developmentally-arrested Aph-2 embryos, as well as some viable escaper progeny. For genotypes where aph-2(RNAi) resulted in a zygotic Glp-1-like sterility among the escaper progeny, the approximate fraction of Glp sterile worms is indicated.

20 Aph-2 RNAi in a homozygous sel-12Δ background does not obviously enhance sel-12 to more severe presentilin phenotypes. However, significant enhancement is detected in homozygous sel-12Δ worms that are also heterozygous for a hop-1 nonsense mutant (hop-1(ep168) /+). With aph-2 RNAi, about 12% of sel-12Δ; hop-1(ep168) /+ animals display glp-1-like sterility, something never seen for this genotype in the absence of aph-2
25 RNAi. Further, the aph-2 RNAi enhancement is dependent on combined reduction in both presentilins as no interaction is seen with the sel-12Δ.

An additional interaction with aph-2 is observed with an unusual hop-1 allele, ep171. This allele carries a D to N missense alteration in a conserved aspartate residue that

WO 01/85912

PCT/US01/14648

corresponds to the Asp385 residue (located in TM domain 8) of human PS1. A PS1 Asp285Ala mutation results in loss of PS1 function, and also has dominant negative effects on PS1+ expression (Wolfe, M. Nature (1999) 398: 513-517) Like the PS1 D385A alteration, hop-1(ep171) has no wild type presenilin activity: the sel-12Δ; hop-1(ep171) double mutant has a glp-1-like sterility defect similar to sel-12Δ; hop-1Δ. In a sel-12+ background, hop-1(ep171) results in a very low penetrance (<1%) glp-1-like sterility phenotype, which suggests it must have dominant negative effects on sel-12 presenilin function or expression. We found that RNAi of aph-2 in homozygous hop-1(ep171) hermaphrodites results in highly penetrant glp-1-like sterility (>50% of viable progeny), indicating a strong additive interaction between reduced aph-2+ function and the hop-1(ep171) dominant effects.

Finally, we also observed that aph-2 RNAi strongly enhances pen-1 and pen-2 mutant phenotypes. Homozygous adult pen-1 and pen-2 hermaphrodites segregating from heterozygous stocks have a normal-appearing germline and never exhibit glp-1-like sterility. In contrast, the corresponding pen-1; aph-2(RNAi) and pen-2; aph-2(RNAi) hermaphrodites display glp-1-like sterility at high penetrance (>50% of viable pen-1 or pen-2 homozygous progeny). These observations demonstrate that a variety genetic backgrounds with partially reduce presenilin pathway activity can be enhanced to stronger phenotypes by an RNAi-mediated reduction in aph-2 activity. The data demonstrate a functional interaction of aph-2 with presenilins and pen-1 and pen-2.

Structure of APH-2 and APH-2 related human and fly proteins. APH-2 contains a PSORT2 predicted cleavable signal sequence and 1 to 3 transmembrane domains predicted by PSORT2 and TopPred2. APH-2 is 18% identical in amino acid sequence to the predicted human protein encoded by the nearly full-length cDNA KIAA0253 (Nagase, T. et al. DNA research (1996) 3: 321-329). In addition, APH-2 shows a similar level of identity to a Drosophila protein predicted from contigged ESTs generated at Exelixis, Inc. The human and Drosophila APH-2 related proteins are 30% identical and Clustal alignments of the 3 proteins show conservation over entire length of each protein.

Methods: RNA mediated interference (RNAi). RNAi of specific genes was generally done using dsRNA prepared from templates of PCR-amplified genomic DNA fragments. The 5' end of the PCR primers contained the promoter sequences for T7 RNA polymerase and the 3' regions were designed such that they amplified one or more exons of the targeted gene. PCR reactions, employing 5mmole of each primer, and 0.5 mg of wild-type genomic in a 50ml reaction, were done using the Expand kit (Roche Biochemicals, Summerville, NJ), according to the manufacture's protocols. The PCR conditions were as follows: an initial denaturation at 95 C for 30sec, followed by 35 cycles of 94 C for 30sec, 55 C for 15 sec, 72 C for 1min, and a final extension at 72 C for 3min. Amplified DNA was ethanol precipitated

WO 01/85912

PCT/US01/14648

and resuspended in 20ml of RNase-free water. A portion of the PCR product was used as template for a T7 polymerase-directed in vitro transcription reaction according to the manufacturer's instructions (Promega, Inc). Reactions were precipitated with ethanol and RNA was resuspended in 20 ml of RNase-free water and 10 ml 3X IM buffer (20mM KPO₄ pH7.5, 3mM K+Citrate pH 7.5, 2% PEG 6000). The complementary sense- and anti- sense RNAs were annealed by incubation at 68 C for 10 minutes, followed by incubation 37 C for 30 minutes, and then centrifuged through a 0.45 um cellulose acetate filter. Microinjection of RNA was done as described (Fire et al., Development (1991) 113:503-514) using hermaphrodites at the L4 or young adult stage. Injected worms were recovered in M9 buffer (per liter: 30g Na₂HPO₄, 15g KH₂PO₄, 2.5g NaCl, 5g NH₄Cl) for 10-30 minutes, transferred to individual plates, and then transferred to new plates daily. The first generation self-progeny of injected hermaphrodites were inspected for RNAi induced phenotypes by observation in the dissecting microscope or in the compound microscope equipped with Nomarski differential interference optics.

C. elegans strains used. Methods for handling and culturing *C. elegans* have been described (Brenner, S. Genetics (1974) 77: 71-94). *C. elegans* variation. Bristol strain N2 represents wild type and is largely isogenic with most of the mutant strains used here. Specific mutations used for genetic mapping and characterization included: LG I - unc-74(x19), dpy-5(e61), unc-29(e1072), fog-3(q443), dpy-24(s71). LG III - dpy-19(e1259ts), unc-119(e2498), pha-1(e2123), dpy-18(n499 or e364). LG IV - him-8(e1489). LG X lon-2(e678). Rearrangements: mnDp66 (X; I). All are described in *C. elegans* II. Deletion mutations that remove most or part of the of sel-12 or hop-1 coding region are described below. Because the sel-12 gene is sex-linked and sel-12 mutants are mating defective, the transfer of sel-12Δ between strains was usually accomplished using males that carry the chromosomal duplication mnDp66 (X; I) which carries a complementing sel-12+ allele.

SNP Screening by DHPLC: Candidate SNPs were amplified separately from CB4856 and N2 genomic DNA. The PCR products were mixed, denatured and reannealed to create heterozygote molecules for screening by Denaturing HPLC (DHPLC). Each SNP was screened at 5 different temperatures using the same separation gradient. A SNP was deemed authentic when a heteroduplex was detected in the heterozygous state but not in the homozygous starting strains. The appropriate temperature for each SNP was noted and used for screening that SNP on recombinant worms.

SNP Scoring on recombinant worms: Lysates from appropriate recombinants were used as genomic DNA templates for amplifying the SNPs by PCR. These crude PCR products were then run on DHPLC using the appropriate temperatures for each SNP identified above.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

For each recombinant, each SNP was typed and the data input into a spreadsheet at random. The physical order of the SNPs was then determined from AceDB. This generated a haplotype for each recombinant, and the locations at which recombination events occurred was noted.

5 Isolation and characterization of sel-12 and hop-1 deletion mutant strains. Deletion alleles of sel-12 and hop-1 were obtained by the two-step method of Plasterk (Plasterk, R. C. elegans: Modern Biological Analysis of an Organism (1995) pp. 59-80) using mut-2 as a source of Tc1 transposon mutator activity. sel-12(ep6) (hereinafter referred to as sel-12Δ) is a deletion mutation that removes amino acids 34 to 441 of the sel-12 open reading frame. hop-1(ep90) (hereinafter referred to as hop-1) is a 722 bp deletion that starts at amino acid 10 216 in the hop-1 open reading frame and terminates within the gene's 3' untranslated region. The sel-12Δ and hop-1Δ single mutants were backcrossed at least 10 times to wild-type (C. elegans variation. bristol strain N2, supra) before phenotypic characterization and construction of double mutants. The sel-12Δ single mutant has an egg-laying defective phenotype similar to that of previously-described sel-12(lf) mutants (Levitan, D. and 15 Greenwald, I. Nature (1995) 377:351-354). The hop-1Δ mutant has no gross phenotypic abnormalities, similarly to hop-1 deletion alleles described by others (Westlund, B. et al. Proc. Natl. Acad. Sci (1999) 96: 2497-2502).

To provide a source of sel-12Δ, hop-1Δ double mutants that lack maternal sel-12+ activity, we constructed a balanced sel-12Δ/sel-12Δ; hop-1Δ +/- unc-74 strain. This strain 20 segregates doubly mutant sel-12Δ; hop-1Δ hermaphrodites that exhibit a completely penetrant sterile phenotype with germline proliferation defects characteristic of glp-1(lf) mutants (Austin, J. and Kimble, J., Cell (1987) 51:589-599). In addition, these worms have a fully penetrant 2 anchor cell phenotype and an everted vulva phenotype that is reminiscent of vulval defects caused by lin-12(lf) mutations.

25 Isolation of enhancers of sel-12Δ. Enhancer alleles of pen-1 and pen-2 were obtained after mutagenesis of a homozygous sel-12Δ strain or, in later experiments, a sel-12Δ; unc-74(x19) strain (the unc-74 mutation lies near hop-1 on chromosome I and was included to provide a built-in mapping resource). XX hermaphrodites of either genotype were mutagenized with ethyl methane sulfonate as described (Brenner, S. Genetics (1974) 77: 30 71-94). In the F1 generation, one (or sometimes two) hermaphrodites were picked onto individual growth plates (approximately 55,000 plates total). Three to five days later, the plates were screened for the appearance of sterile F2 progeny with a "dark" appearance indicative of a defect in germline proliferation. Candidate sterile mutants were then screened by Nomarski difference interference microscopy to identify those which exhibit glp-1 like 35 sterility similar to sel-12Δ; hop-1Δ worms.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

A set of 44 candidates identified in this way were subjected to a cross scheme designed to determine whether or not the sterile phenotype in these mutants was dependent on the worm's sel-12 genotype as would be expected for a sel-12 enhancer. For this test, each candidate was crossed to dpy-19 III; him-8; lon-2 males and the resulting cross-progeny were picked onto individual plates. In the following generation, the presence of sterile lon-2/lon-2 progeny (which are sel-12+/sel-12+ in the absence of recombination) indicate that sterile phenotype was not dependent on a loss of sel-12+ activity and was possibly due to a mutation in one of the known glp-1 pathway genes (glp-1, lag-1, lag-2). 29 candidates analyzed in this way were sel-12 independent and thus were rejected as possible presenilin enhancers. For 26 of the 29 rejected candidates, the mutation causing sterility segregated in trans to dpy-19, which is the expected behavior for a glp-1 allele. 9 of these LG III mutations failed to complement the sterile phenotype of known glp-1 alleles; the other 17 LG III mutations were not tested.

For the remaining 15 candidates, the Glp sterile phenotype did not reappear in the F2 generation, a result consistent with the presence of an enhancer mutation whose interaction with sel-12 is rescued by maternal sel-12+ activity. This explanation was tested by picking sel-12/sel-12 worms in the F2 generation onto individual plates and examining their progeny for reappearance of glp-1-like sterility in the next generation. This was the result observed for each of the remaining 15 candidates. A combination of complementation tests, meiotic mapping, and sequence analysis of mutant alleles demonstrated that the each candidate carried a mutation in either hop-1 (8 candidates) or in either of two newly-identified genes, pen-1 (4 candidates) or pen-2 (3 candidates).

Pen-1 mapping, characterization, cloning, and computational analysis: Genetic mapping of pen-1 was done in sel-12Δ backgrounds and was based on the glp-1-like sterility phenotype of doubly mutant pen-1; sel-12Δ worms. We initially mapped pen-1(ep140) to chromosome I between unc-29 and dpy-24. Further mapping with visible markers narrowed the position to between unc-29 and fog-3, a 1.1 MB interval. From heterozygotes of the genotype pen-1/unc-29 fog-3 trans-heterozygotes, 16/20 Unc-29 non-Fog-3 recombinants and 1/4 Fog-3 non-Unc-29 recombinants segregated pen-1.

Finer mapping was done using SNP markers that are polymorphic between the N2 Bristol strain from which pen-1 mutants were derived and strain CB4856 Hawaiian strain of *C. elegans*. The Genome Sequencing Center (St. Louis, MO) has identified a large number of potential SNPs in CB4856 (<http://genome.wustl.edu/gsc/CEpolymorph/snp.shtml>). Four of these potential SNPs in the unc-29 to fog-3 interval were confirmed by testing with an SNP genotyping assay that is based on separation of heteroduplex PCR products by denaturing HPLC (Underhill PA, et al., Genome Res. 1997 Oct;7(10):996-1005). Initial

WO 01/85912

PCT/US01/14648

mapping against these SNPs was done by constructing heterozygotes of the genotypes *unc-29* *pen-1*/CB4856 or *pen-1* *dpy-24*/CB4956 and picking *Unc-29* non-*Pen-1* or *Dpy-24* non-*Pen-1* recombinants. Additional non-*Pen-1* recombinants were isolated from *unc-29* *pen-1* *fog-3*/CB4856 heterozygotes. Among 50 *Unc-29* non-*Pen-1* recombinants, 9 had cross-overs occurring to the right of the C31H5 SNP, placing *pen-1* to the right of this marker. Among a combined set of 45 *Dpy-24* non-*Pen-1* or *Fog-3* non-*Pen-1* recombinants, 4 had cross-overs to the left of the F14B4 SNP, placing *pen-1* left of this marker. The combined data positioned *pen-1* to the ~240 KB interval between the C31H5 and F14B4 SNPs.

For mapping *pen-1* to smaller intervals, additional SNPs lying in the C45G3 to F14B4 interval were identified by DNA sequencing. Six approximately 2 KB segments of DNA in the interval were amplified by PCR of N2 and CB4856 genomic DNA and end sequenced. In some cases, additional sequencing primers were used to generate internal sequence. SNPs between N2 and CB4856 were identified by sequence alignment and ~200 bp PCR products were designed around each high quality candidate. These 200 bp products were screened and scored by DHPLC as described above. This analysis positioned *pen-1* between 2 SNPs, one on cosmid C45G3 and the other on cosmid F36H2, that lie approximately 52 KB from one another.

Mutation detection. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs), labeled C45G3A and F36H2A, defined a 52kb genomic interval, *pen-1*, within which seven predicted candidate genes resided. A 30kb gene-rich section of this 52kb interval was resequenced in 3 worms whose mutation had been mapped genetically to this region, ep140, ep169, and ep170. All DNA sequencing reactions were performed using standard protocols for the BigDye sequencing reagents (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA) and products were analyzed using ABI 377 DNA sequencers.

Trace data obtained from the ABI 377 DNA sequencers was analyzed and assembled into contigs using the Phred-Phrap programs (Gordon, *Genome Res.* (1998) 8:195-202). The resequence data was then compared to the wildtype strain, N2, for polymorphism. This analysis identified a third position base change, G to an A, at 191AA in the VF36H2L.1 gene (GI# 2815036) in three *pen-1* alleles, ep140, ep169 and ep170, resulting in an amino acid change from a tryptophan (W) to stop (*). Further sequencing analysis of unmapped mutants revealed another mutation in worm ep216 within the same codon, but in the second position, also a G to an A, resulting in the same amino acid change. Analysis of human *pen-1* led us to identify the novel *pen-1B* protein.

Pen-2 mapping, characterization, cloning, and computational analysis. We initially positioned *pen-2*(ep220) to the left of *unc-25* on chromosome III. From hermaphrodites of

WO 01/85912

PCT/US01/14648

the genotype pen-2/ dpy-18 unc-25, 4/4 non-Dpy-18 Unc-25 recombinants segregated pen-2 and 0/21 Dpy-18 non-Unc-25 recombinants segregated pen-2. Of 70 dpy-18 unc-25 homozygotes picked from the same heterozygous hermaphrodites, only 2 segregated pen-2, indicating that pen-2 lies relatively close to dpy-18 and probably to the left of this gene.

Further mapping positioned pen-1 between pha-1 and dpy-18: from pen-1/ pha-1 dpy-19; sel-12Δ hermaphrodites, 1/14 non-Pha-1 Dpy-1 recombinants picked up pen-2. These data positioned pen-2 between pha-1 and dpy-18 interval, an approximately 240 KB interval, and suggested pen-2 lies close to dpy-18.

Identification of pen-2 as predicted gene T28D6.9: We determined that pen-2 is the predicted gene T28D6.9 (GI#3873415) based on 1) RNAi of predicted genes in the pha-1 to dpy-18 interval and 2) mutation detection. For 28 of the 31 genes in the interval, primers tailed with T7 promoter sequence were used to amplify selected coding region using either a first-strand cDNA pool or genomic DNA as template as described above. Double-stranded RNA was synthesized from each PCR product and injected into sel-12Δ homozygotes. RNAi of T28D6.9 produced the expected pen-2 phenotypes among the progeny of injected worms, including glp-1-like sterility in sel-12Δ worms and an Aph embryonic arrest phenotype after injection into N2 and sel-12Δ worms. Mutation detection of the T28D6.9 open reading frame identified nonsense mutations in each of three pen-2 alleles (ep219, ep220, ep221). Briefly, The single mutant in this group, ep220, was tested by sequencing a PCR product amplified in an ep220 lysate and wild-type strain. This analysis identified a G to A mutation at 74AA that resulted in a tryptophan (W) to stop (*). Additional sequencing analysis of unmapped mutants revealed that there were 2 more mutants in this group. The ep219 worm had a G to A change in the third position of 74AA that produced a W to a *. The ep221 worm had a G to A change in another W that also resulted in a stop codon at 36AA. These three changes all effect highly conserved tryptophans that could significantly alter or ablate the function of the T28D6.9 gene.

V. Cell-based reporter assays.

We developed a cell culture gamma secretase assay based on a reporter construct carrying the C-terminal 99 amino acids of APP fused to a Gal4VP16 transcriptional activator protein. The Gal4 moiety is retained at the cell surface by the APP transmembrane domain until presenilin-dependent cleavage releases it to translocate to the nucleus and activate transcription of a UAS-luciferase reporter transgene. In assay validation experiments, a known gamma secretase inhibitor completely blocked reporter gene activity, and known dominant negative presenilin mutations also inhibited the reporter activity. A conceptually similar assay has been shown previously to work in *Drosophila* in vivo using a UAS-beta-galactosidase transgene reporter. Beta-galactosidase reporter gene activity, and hence

WO 01/85912

PCT/US01/14648

gamma-secretase-like protease activity have been shown to be absolutely dependent on the presence of presenilin in this in vivo assay.

Our data show that inhibition of pen-1, pen-2, aph-2 or presenilin results in a strong reduction of steady state presenilin protein levels, and a correlated reduction of gamma-secretase activity. The effects of pen-1 or aph-2 inhibition is equally strong, and pen-2 nearly as strong, with respect to both reduction of gamma secretase activity and presenilin protein reduction as is presenilin inhibition itself. Presenilin reduction is verified in multiple cell-based systems, including Drosophila and human cell systems, using several inhibitors, including RNAi, heterocyclic compounds identified in the disclosed screens, and intrabodies. These data provide assays for a functional interaction of the pen genes and presenilin. Hence, the invention provides a method for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of a presenilin enhancer (pen) polypeptide with a presenilin by introducing a predetermined stress into a system which provides a functional interaction of a pen polypeptide with a presenilin, whereby the system provides a stress-biased interaction of the pen polypeptide with the presenilin, wherein the absence of the stress, the system provides an unbiased interaction of the pen polypeptide with the presenilin; and detecting the stress-biased interaction of the pen polypeptide with the presenilin as a change in an amount of presenilin in the system, wherein the amount may be expressed as an amount of presenilin N or C-terminal fragments (NTFs), presenilin holoprotein, or a ratio thereof, wherein a difference between the stress-biased and unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen polypeptide with the presenilin.

All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference. Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of a presenilin enhancer (pen) polypeptide with Notch or APP processing, the method comprising steps:

5 introducing a predetermined stress into a system which provides a functional interaction of a pen polypeptide with Notch or APP processing, whereby the system provides a stress-biased interaction of the pen polypeptide with Notch or APP processing, wherein the absence of the stress, the system provides unbiased interaction of the pen polypeptide with Notch or APP processing; and

10 detecting the stress-biased interaction of the pen polypeptide with Notch or APP processing, wherein a difference between the stress-biased and unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen polypeptide with Notch or APP processing;

15 wherein the system is selected from the group consisting of: (i) a viable cell expressing the pen polypeptide wherein the pen polypeptide expression is determined to be non-natural or pathogenic, and (ii) an in vitro, cell-free mixture comprising a determined amount of the pen polypeptide,

20 wherein the pen polypeptide has sequence similarity to a pen polypeptide selected from the group consisting of: human, rat, mouse, *D. melanogaster* and *C. elegans* pen-2; human, mouse, *D. melanogaster* and *C. elegans* pen-1; and human pen-1B, wherein the similarity is at least 20% identity.

2. A method for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of an enhancer of presenilin (pen) polypeptide with APP processing, the method comprising steps:

25 introducing a predetermined stress into a system which provides a functional interaction of a pen polypeptide with APP processing, whereby the system provides a stress-biased interaction of the pen polypeptide with APP processing, wherein the absence of the stress, the system provides unbiased interaction of the pen polypeptide with APP processing; and

30 detecting the stress-biased interaction of the pen polypeptide with APP processing, wherein a difference between the stress-biased and unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen polypeptide with APP processing;

wherein the system is selected from the group consisting of: (i) a viable cell expressing the pen polypeptide wherein the pen polypeptide expression is determined to be

WO 01/85912

PCT/US01/14648

non-natural or pathogenic, and (ii) an in vitro, cell-free mixture comprising a determined amount of the pen polypeptide,

wherein the pen polypeptide has sequence similarity to a pen polypeptide selected from the group consisting of: human, rat, mouse, D. melanogaster or C. elegans pen-2; human, mouse, D. melanogaster or C. elegans pen-1; human pen-1B; and human, D. melanogaster or C. elegans Aph-2, wherein the similarity is at least 20% identity.

3. A method for specifically detecting a stress that alters a functional interaction of a presenilin enhancer (pen) polypeptide with a presenilin, the method comprising steps:

introducing a predetermined stress into a system which provides a functional interaction of a pen polypeptide with a presenilin, whereby the system provides a stress-biased interaction of the pen polypeptide with the presenilin, wherein the absence of the stress, the system provides an unbiased interaction of the pen polypeptide with the presenilin; and

detecting the stress-biased interaction of the pen polypeptide with the presenilin as a change in an amount of presenilin in the system, wherein the amount may be expressed as an amount of presenilin N or C-terminal fragments (NTFs), presenilin holoprotein, or a ratio thereof, wherein a difference between the stress-biased and unbiased interactions indicates that the stress alters the interaction of the pen polypeptide with the presenilin;

wherein the system is selected from the group consisting of: (i) a viable cell expressing the pen polypeptide wherein the pen polypeptide expression is determined to be non-natural or pathogenic, and (ii) an in vitro, cell-free mixture comprising a determined amount of the pen polypeptide,

wherein the pen polypeptide has sequence similarity to a pen polypeptide selected from the group consisting of: human, rat, mouse, D. melanogaster and C. elegans pen-2; human, mouse, D. melanogaster and C. elegans pen-1; and human pen-1B, wherein the similarity is at least 20% identity.

4. A method according to claim 1, 2 or 3, wherein the pen polypeptide is selected from the group consisting of: human, rat, mouse, D. melanogaster and C. elegans pen-2.

5. A method according to claim 1, 2 or 3, wherein the pen polypeptide is selected from the group consisting of: human, mouse, D. melanogaster and C. elegans pen-1.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

6. A method according to claim 1, 2 or 3, wherein the pen polypeptide is human pen-1B.
7. A method according to claim 1, 2 or 3, wherein said the pen polypeptide is a naturally-occurring pen polypeptide identifiable in a sel-12Δ(delta) homozygous *C. elegans* genetic mutation enhancer screen.
- 5
8. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the identity is at least 50%.
9. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the identity is 100%.
- 10
10. A method according to claim 1, 4, 5, 6, 7, 8 or 9, wherein the functional interaction comprises binding of the pen polypeptide with a component of Notch or APP processing.
11. A method according to claim 1, 4, 5, 6, 7, 8 or 9, wherein the functional interaction comprises binding of the pen polypeptide with a component of Notch or APP processing and the component is a presenilin or γ -secretase.
- 15
12. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11 wherein the system is the viable cell and the stress is a pharmacologically active agent.
- 20
13. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11 wherein the system is the viable cell and the stress is a deficiency in functional expression of the pen polypeptide.
14. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11 wherein the system is the viable cell and the stress is a deficiency in functional expression of the pen polypeptide by virtue of genomic disruption of otherwise endogenous alleles encoding the pen polypeptide.
- 25
15. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11 wherein the system is the viable cell and the stress is a deficiency in functional expression of the pen polypeptide by virtue of coexpression of a polynucleotide comprising a sequence antisense of an endogenous allele encoding the pen polypeptide.
- 30

WO 01/85912

PCT/US01/14648

16. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the system is the viable cell and the cell is in situ (resident in an animal host).
17. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the system is the viable cell and the cell is in vitro (isolated from an animal host).
- 5
18. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the system is the in vitro, cell-free mixture and the stress is a pharmacologically active agent.
19. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects an indication of Alzheimer's disease.
- 10
20. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects a transcriptional reporter of notch.
21. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects the generation of A β (beta).
- 15
22. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects the generation of A β (beta) using an A β -specific antibody.
- 20
23. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects a structural alteration in the pen polypeptide.
24. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the detecting step detects a structural alteration in the pen polypeptide using a pen polypeptide-specific antibody.
- 25
25. A method according to claim 3, wherein the change in amount of detectable presenilin is detected by presenilin-specific antibodies.
- 30

WO 01/85912

PCT/US01/14648

26. A method according to claim 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11,, wherein the system is the viable cell and comprises a gamma secretase reporter.
27. A method according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the system is the viable cell and comprises a gamma secretase reporter comprising a C-terminal APP - Gal4 fusion protein and a UAS-reporter transgene, whereby cleavage of the fusion protein by gamma secretase releases Gal4, which in turn activates transcription of the transgene to express the reporter.
28. A method according to claim 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, or 11, wherein the pen polypeptide is selected from the group consisting of: human, *D. melanogaster* or *C. elegans* Aph -2.
29. An isolated polypeptide comprising a sequence having at least 50% sequence similarity to SEQ ID NO:1; wherein the polypeptide or fragment cross-reacts with a human pen-1B specific antibody.
30. A polypeptide according to claim 28 wherein the polypeptide binds a human presenilin or γ -secretase.
31. A polypeptide according to claim 29 or 30 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| SEQ ID NO:6, res 1-14; | SEQ ID NO:6, res 115-126; |
| SEQ ID NO:6, res 6-15; | SEQ ID NO:6, res 130-140; |
| SEQ ID NO:6, res 10-20; | SEQ ID NO:6, res 139-151; |
| SEQ ID NO:6, res 25-46; | SEQ ID NO:6, res 166-182; |
| SEQ ID NO:6, res 62-71; | SEQ ID NO:6, res 184-198; |
| SEQ ID NO:6, res 67-76; | SEQ ID NO:6, res 214-232; and |
| SEQ ID NO:6, res 72-95; | SEQ ID NO:6, res 246-257. |
32. A polypeptide according to claim 29 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NOS:2-10.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

33. A polypeptide according to claim 29 comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:6, residues 1-254; SEQ ID NO:6, residues 4-255; SEQ ID NO:6, residues 9-257; and SEQ ID NO:6, residues 2-255.
34. A polypeptide according to claim 29 comprising SEQ ID NO:2.
- 5
35. A recombinant polynucleotide encoding a polypeptide according to claim 29, 30, 31, 32, 33 or 34..
36. A recombinant polynucleotide encoding a polypeptide according to claim 29, 30, 31, 32, 33 or 34 contained in a vector or a cell.
- 10
37. A method of making a polypeptide, said method comprising steps: introducing a polynucleotide according to claim 29, 30, 31, 32, 33 or 34 into a host cell or cellular extract, incubating said host cell or extract under conditions whereby said polynucleotide is expressed as a transcript and said transcript is expressed as a translation product comprising said polypeptide.
- 15
38. A method of screening for an agent that modulates the interaction of a pen-IB polypeptide to a binding target, said method comprising the steps of:
- 20 incubating a mixture comprising:
- an isolated polypeptide according to claim 29, 30, 31, 32, 33 or 34,
 - a binding target of said polypeptide, and
 - a candidate agent;
- under conditions whereby, but for the presence of said agent, said polypeptide specifically binds said binding target at a reference affinity;
- 25 detecting the binding affinity of said polypeptide to said binding target to determine an agent-biased affinity,
- wherein a difference between the agent-biased affinity and the reference affinity indicates that said agent modulates the binding of said polypeptide to said binding target.
- 30

WO 01/85912

PCT/US01/14648

39. A method according to claim 38, wherein said binding target comprises a human presenilin or γ -secretase.
40. A method of screening for an agent that modulates the interaction of a pen-1B polypeptide to a binding target, said method comprising the steps of:
- 5 incubating a polynucleotide according to claim 29, 30, 31, 32, 33 or 34 under conditions whereby the polypeptide is expressed;
- incubating a mixture comprising said polypeptide, a binding target of said polypeptide, and a candidate agent under conditions whereby, but for the presence of said agent, said polypeptide specifically binds said binding target at a reference affinity;
- 10 detecting the binding affinity of said polypeptide to said binding target to determine an agent-biased affinity,
- wherein a difference between the agent-biased affinity and the reference affinity indicates that said agent modulates the binding of said polypeptide to said binding target.
- 15 41. A method according to claim 40, wherein said polynucleotide is in a cell.
42. A method according to claim 40, wherein said binding target comprises a presenilin or γ -secretase.

WO 01/85912

PCT/US01/14648

SEQUENCE LISTING

<110> Curtis, Dan
 Francis, Ross
 5 McGrath, Garth Joseph
 Nicoll, Sharon Monique
 Ruddy, David Andrew
 Ellis, Michael Christopher
 <120> Presenilin Enhancers
 10 <130> EX00-033
 <140>
 <141>
 <160> 38
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 15
 <210> 1
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans
 20 <400> 1
 Met Gly Tyr Leu Leu Thr Ile Ala Cys Tyr Ile Ala Ser Phe Ser Pro
 1 5 10 15
 Ser Ile Ala Leu Phe Cys Ser Phe Ile Ala His Asp Pro Val Arg Ile
 20 25 30
 25 Ile Leu Phe Phe Leu Gly Ser Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Phe
 35 40 45
 Ser Ser Leu Ala Trp Leu Gly Leu Ser Thr Val Leu Pro Asp Thr Phe
 50 55 60
 Leu Leu Ser Leu Thr Val Cys Ile Ile Ala Gln Glu Leu Ser Arg Val
 30 65 70 75 80
 Ala Tyr Phe Met Leu Leu Lys Lys Ala Gln Arg Gly Leu Asn Lys Ile
 85 90 95
 Thr Arg Gln Gly Gln Ile Ser Val Ala Pro Gly Val Ser Asp Leu His
 100 105 110
 35 Asn Ala Arg His Met Leu Ala Leu Val Cys Gly Leu Gly Met Gly Val
 115 120 125
 Ile Ser Ala Leu Phe Tyr Thr Met Asn Ala Phe Ala Ile Phe Ser Gly
 130 135 140
 Pro Gly Thr Ile Gly Leu Pro Asn Ala Leu Lys Thr Gly Glu Ile Asp

WO 01/85912 PCT/US01/14648

145 150 155 160
 Thr Asn Arg Ala Gly Lys Tyr Leu Pro Leu Cys Tyr Thr Leu Ser Ala
 165 170 175
 Ile Leu Leu Thr Leu Phe His Val Thr Trp Thr Ile Met Val Trp Asp
 180 185 190
 5 Ser Cys His Lys Ile Gly Arg Ile Pro Ser Ala Phe Val Pro Gly Ala
 195 200 205
 Ala Ala Val Val Ser His Leu Leu Val Thr Phe Leu Ser Ser Leu Asn
 210 215 220
 Ser Arg Gly Phe His Val Leu Val Phe Ala Val Gln Phe Leu Ile Leu
 10 225 230 235 240
 Leu Ile Cys Ile Ala Tyr Cys Asn Val Ile Met Gly Gly Thr Ile Ser
 245 250 255
 Ser Phe Val Asn Gly Ile Gly Gln Ser Ile Thr Asp Ala Val Thr Leu
 260 265 270
 15 Lys Gln Val Arg Thr Leu Ile Glu Glu Arg Lys Leu Arg Thr Gln Arg
 275 280 285
 Gln Ser Val Pro Asp Glu Pro Met Thr Glu Arg Ala Gly Thr Ser Asn
 290 295 300

20 Thr Val Asn Ala
 305

<210> 2
 <211> 238
 25 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster
 <400> 2
 Met Thr Leu Pro Glu Phe Phe Gly Cys Thr Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 30 Pro Phe Ala Leu Phe Val Phe Thr Ile Ala Asn Asp Pro Val Arg Ile
 20 25 30
 Ile Ile Leu Ile Ala Ala Ala Phe Phe Trp Leu Leu Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Leu Trp Tyr Ala Leu Ile Pro Leu Lys Glu Phe Leu Ala Phe
 50 55 60
 35 Gly Val Val Phe Ser Val Cys Phe Gln Glu Ala Phe Arg Tyr Ile Ile
 65 70 75 80
 Tyr Arg Ile Leu Arg Ser Thr Glu Gln Gly Leu His Ala Val Ala Glu

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

          100          105          110
Gly Leu Gly Phe Gly Thr Met Ser Gly Ala Phe Ala Leu Ile
          115          120          125

<210> 4
5 <211> 244
  <212> PRT
  <213> mouse
  <400> 4
10 Met Gly Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Thr Phe Val Ala Phe Gly Pro
    1          5          10          15
  Ala Phe Ser Leu Phe Leu Ile Thr Val Ala Gly Asp Pro Leu Arg Val
    20          25          30
  Ile Ile Leu Val Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Leu
    35          40          45
15 Ala Ser Val Val Trp Phe Ile Leu Val His Val Thr Asp Arg Ser Asp
    50          55          60
  Ala Arg Leu Gln Tyr Gly Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Val Ser Val
    65          70          75          80
  Leu Leu Gln Glu Val Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
20 Ala Asp Glu Gly Leu Ala Ser Leu Ser Glu Asp Gly Arg Ser Pro Ile
    85          90          95
  Ser Ile Arg Gln Met Ala Tyr Val Ser Gly Leu Ser Phe Gly Ile Ile
    100          105          110
25 Ser Gly Val Phe Ser Val Ile Asn Ile Leu Ala Asp Ala Leu Gly Pro
    115          120          125
    130          135          140
  Gly Val Val Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser
    145          150          155          160
  Ala Phe Leu Thr Ala Ala Ile Ile Leu Leu His Thr Phe Trp Gly Val
30 Val Phe Phe Asp Ala Cys Glu Arg Arg Tyr Trp Ala Leu Gly Leu
    165          170          175
    180          185          190
  Val Val Gly Ser His Leu Leu Thr Ser Gly Leu Thr Phe Leu Asn Pro
    195          200          205
35 Trp Tyr Glu Ala Ser Leu Leu Pro Ile Tyr Ala Val Thr Val Ser Met
    210          215          220
  Gly Leu Trp Ala Phe Ile Thr Ala Gly Val Pro Ser Glu Val Ser Ser
    225          230          235          240

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Ala Ala Phe Val

<210> 5
 <211> 251
 <212> PRT
 5 <213> human
 <400> 5
 Met Gly Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Thr Phe Val Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Leu Phe Leu Ile Thr Val Ala Gly Asp Pro Leu Arg Val
 10 20 25 30
 Ile Ile Leu Val Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ser Val Val Trp Phe Ile Leu Val His Val Thr Asp Arg Ser Asp
 50 55 60
 15 Ala Arg Leu Gln Tyr Gly Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Val Ser Val
 65 70 75 80
 Leu Leu Gln Glu Val Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
 85 90 95
 Ala Asp Glu Gly Leu Ala Ser Leu Ser Glu Asp Gly Arg Ser Pro Ile
 100 105 110
 20 Ser Ile Arg Gln Met Ala Tyr Val Ser Gly Leu Ser Phe Gly Ile Ile
 115 120 125
 Ser Gly Val Phe Ser Val Ile Asn Ile Leu Ala Asp Ala Leu Gly Pro
 130 135 140
 25 Gly Val Val Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Phe Leu Thr Ala Ala Ile Ile Leu Leu His Thr Phe Trp Gly Val
 165 170 175
 Val Phe Phe Asp Ala Cys Glu Arg Arg Arg Tyr Trp Ala Leu Gly Leu
 180 185 190
 30 Val Val Gly Ser His Leu Leu Thr Ser Gly Leu Thr Phe Leu Asn Pro
 195 200 205
 Trp Tyr Glu Ala Ser Leu Leu Pro Ile Tyr Ala Val Thr Val Ser Met
 210 215 220
 35 Gly Leu Trp Ala Phe Ile Thr Ala Gly Gly Ser Leu Arg Ser Ile Gln
 225 230 235 240
 Arg Ser Ser Cys Val Arg Thr Asp Tyr Leu Asp
 245 250

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

<210> 6
<211> 257
<212> PRT
<213> human
<400> 6
5 Met Thr Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro
  1           5           10           15
Ala Leu Ala Leu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Thr Glu Pro Leu Arg Ile
  20           25           30
10 Ile Phe Leu Ile Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Ile
  35           40           45
Ser Ser Leu Val Trp Phe Met Ala Arg Val Ile Ile Asp Asn Lys Asp
  50           55           60
Gly Pro Thr Gln Lys Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Ala Phe Val Ser Val
  65           70           75           80
15 Tyr Ile Gln Glu Met Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
  85           90           95
Ala Ser Glu Gly Leu Lys Ser Ile Asn Pro Gly Glu Thr Ala Pro Ser
  100          105          110
Met Arg Leu Leu Ala Tyr Val Ser Gly Leu Gly Phe Gly Ile Met Ser
  115          120          125
20 Gly Val Phe Ser Phe Val Asn Thr Leu Ser Asp Ser Leu Gly Pro Gly
  130          135          140
Thr Val Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Ser Ala
  145          150          155          160
25 Phe Met Thr Leu Val Ile Ile Leu Leu His Val Phe Trp Gly Ile Val
  165          170          175
Phe Phe Asp Gly Cys Glu Lys Lys Lys Trp Gly Ile Leu Leu Ile Val
  180          185          190
Leu Leu Thr His Leu Leu Val Ser Ala Gln Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
  195          200          205
30 Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Ile Ile Leu Val Leu Met Gly
  210          215          220
Thr Trp Ala Phe Leu Ala Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Leu Lys Leu
  225          230          235          240
35 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
  245          250          255
Arg

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

<210> 7
<211> 101
<212> PRT
<213> Caenorhabditis elegans
<400> 7
5 Met Asp Ile Ser Lys Leu Thr Asp Val Lys Lys Val Asp Leu Cys Lys
  1           5           10           15
  Lys Tyr Phe Leu Ile Gly Ala Cys Phe Leu Pro Leu Val Trp Ile Val
    20           25           30
  Asn Thr Phe Trp Phe Phe Ser Asp Ala Phe Cys Lys Pro Ile Asn Ala
10           35           40           45
  His Arg Arg Gln Ile Arg Lys Tyr Val Ile Ala Ser Ile Val Gly Ser
  50           55           60
  Ile Phe Trp Ile Ile Val Leu Ser Ala Trp Glu Ile Phe Phe Gln His
  65           70           75           80
15 Tyr Arg Ala Gln Gly Leu Val Trp Thr Asp Phe Leu Thr Phe Val Phe
  85           90           95
  Pro Thr Gly Arg Val
    100

20 <210> 8
<211> 101
<212> PRT
<213> Drosophila melanogaster
<400> 8
25 Met Asn Ile Ser Lys Ala Pro Asn Pro Arg Lys Leu Glu Leu Cys Arg
  1           5           10           15
  Lys Tyr Phe Phe Ala Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Val Trp Ala Ile
    20           25           30
  Asn Val Cys Trp Phe Phe Thr Glu Ala Phe His Lys Pro Pro Phe Ser
30           35           40           45
  Glu His Ser Gln Ile Lys Arg Tyr Val Ile Tyr Ser Ala Val Gly Thr
  50           55           60
  Leu Phe Trp Leu Ile Val Leu Thr Ala Trp Ile Ile Ile Phe Gln Thr
  65           70           75           80
35 Asn Arg Thr Ala Trp Gly Ala Thr Ala Asp Tyr Met Ser Phe Ile Ile
  85           90           95
  Pro Leu Gly Ser Ala
    100

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

<210> 9
<211> 101
<212> PFT
<213> rat
<400> 9
5 Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
  1      5      10      15
Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
  20      25      30
Asn Ile Phe Trp Phe Phe Lys Glu Ala Phe Phe Ala Pro Ala Tyr Ser
10      35      40      45
Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
  50      55      60
Leu Phe Trp Val Ile Val Leu Thr Thr Trp Ile Thr Ile Phe Gln Ile
  65      70      75      80
15 Tyr Arg Pro Arg Trp Gly Ala Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Phe Thr Ile
  85      90      95
Pro Leu Gly Thr Pro
  100

20 <210> 10
<211> 101
<212> PRT
<213> mouse
<400> 10
25 Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
  1      5      10      15
Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
  20      25      30
Asn Ile Phe Trp Phe Phe Arg Glu Ala Phe Leu Ala Pro Ala Tyr Thr
30      35      40      45
Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
  50      55      60
Leu Phe Trp Val Ile Ile Leu Ala Thr Trp Ile Thr Ile Phe Gln Ile
  65      70      75      80
35 Tyr Arg Pro Arg Trp Gly Ala Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Phe Thr Ile
  85      90      95
Pro Leu Gly Thr Pro
  100

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

<210> 11
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 11
 5 Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
 20 25 30
 Asn Ile Phe Trp Phe Phe Arg Glu Ala Phe Ile Val Pro Ala Tyr Thr
 10 35 40 45
 Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
 50 55 60
 Phe Leu Trp Val Ile Val Leu
 65 70
 15
 <210> 12
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> human
 <400> 12
 20 Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
 20 25 30
 25 Asn Ile Phe Trp Phe Phe Arg Glu Ala Phe Leu Val Pro Ala Tyr Thr
 35 40 45
 Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
 50 55 60
 Leu Phe Trp Val Ile Val Leu Thr Ser Trp Ile Thr Ile Phe Gln Ile
 30 65 70 75 80
 Tyr Arg Pro Arg Trp Gly Ala Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Phe Thr Ile
 85 90 95
 Pro Leu Gly Thr Pro
 100
 35
 <210> 13
 <211> 721
 <212> PRT

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

<213> Caenorhabditis elegans
<400> 13
Met Lys Lys Trp Leu Val Ile Val Leu Ile Ile Ala Gly Ile Arg Cys
 1           5           10           15
Asp Gly Phe Ser Asp Gln Val Phe Arg Thr Leu Phe Ile Gly Glu Gly
 5           20           25           30
Asn Ala Cys Tyr Arg Thr Phe Asn Lys Thr His Glu Phe Gly Cys Gln
 35           40           45
Ala Asn Arg Glu Asn Glu Asn Gly Leu Ile Val Arg Ile Asp Lys Gln
 50           55           60
10 Glu Asp Phe Lys Asn Leu Asp Ser Cys Trp Asn Ser Phe Tyr Pro Lys
 65           70           75           80
Tyr Ser Gly Lys Tyr Trp Ala Leu Leu Pro Val Asn Leu Ile Arg Arg
 85           90           95
Asp Thr Ile Ser Gln Leu Lys Ser Ser Lys Cys Leu Ser Gly Ile Val
15           100          105          110
Leu Tyr Asn Ser Gly Glu Ser Ile His Pro Gly Asp Glu Ser Thr Ala
 115          120          125
Ala Ser His Asp Ala Glu Cys Pro Asn Ala Ala Ser Asp Tyr Tyr Leu
 130          135          140
20 Gln Asp Lys Asn Glu Glu Tyr Cys Glu Arg Lys Ile Asn Ser Arg Gly
 145          150          155          160
Ala Ile Thr Arg Asp Gly Leu Met Lys Ile Asp Trp Arg Ile Gln Met
 165          170          175
Val Phe Ile Asp Asn Ser Thr Asp Leu Glu Ile Ile Glu Lys Cys Tyr
25           180          185          190
Ser Met Phe Asn Lys Pro Lys Glu Asp Gly Ser Ser Gly Tyr Pro Tyr
 195          200          205
Cys Gly Met Ser Phe Arg Leu Ala Asn Met Ala Ala Gly Asn Ser Glu
 210          215          220
30 Ile Cys Tyr Arg Arg Gly Lys Asn Asp Ala Lys Leu Phe Gln Met Asn
 225          230          235          240
Ile Asp Ser Gly Asp Ala Pro Gln Leu Cys Gly Ala Met His Ser Asp
 245          250          255
Asn Ile Phe Ala Phe Pro Thr Pro Ile Pro Thr Ser Pro Thr Asn Glu
35           260          265          270
Thr Ile Ile Thr Ser Lys Tyr Met Met Val Thr Ala Arg Met Asp Ser
 275          280          285
Phe Gly Met Ile Pro Glu Ile Ser Val Gly Glu Val Ser Val Leu Thr

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

290 295 300
 Ser Ile Ile Ser Val Leu Ala Ala Ala Arg Ser Met Gly Thr Gln Ile
 305 310 315 320
 Glu Lys Trp Gln Lys Ala Ser Asn Thr Ser Asn Arg Asn Val Phe Phe
 325 330 335
 5 Ala Phe Phe Asn Gly Glu Ser Leu Asp Tyr Ile Gly Ser Gly Ala Ala
 340 345 350
 Ala Tyr Gln Met Glu Asn Gly Lys Phe Pro Gln Met Ile Arg Ser Asp
 355 360 365
 Arg Thr His Ile His Pro Ile Arg Pro Asn Glu Leu Asp Tyr Ile Leu
 10 370 375 380
 Glu Val Gln Gln Ile Gly Val Ala Lys Gly Arg Lys Tyr Tyr Val His
 385 390 395 400
 Val Asp Gly Glu Arg Tyr Gln Gln Asn Lys Thr Gln Thr Asp Arg Val
 405 410 415
 15 Ile Asp Arg Ile Glu Arg Gly Leu Arg Ser His Ala Phe Asp Leu Glu
 420 425 430
 Lys Pro Ser Gly Ser Gly Asp Arg Val Pro Pro Ala Ser Trp His Ser
 435 440 445
 20 Phe Ala Lys Ala Asp Ala His Val Gln Ser Val Leu Leu Ala Pro Tyr
 450 455 460
 Gly Lys Glu Tyr Glu Tyr Gln Arg Val Asn Ser Ile Leu Asp Lys Asn
 465 470 475 480
 Glu Trp Thr Glu Asp Glu Arg Glu Lys Ala Ile Gln Glu Ile Glu Ala
 485 490 495
 25 Val Ser Thr Ala Ile Leu Ala Ala Ala Ala Asp Tyr Val Gly Val Glu
 500 505 510
 Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Val Asp Lys Lys Leu Ile Thr Thr Ile
 515 520 525
 Phe Asp Cys Leu Ile Thr Ser Asn Phe Trp Phe Asp Cys Asp Phe Met
 30 530 535 540
 Gln Lys Leu Asp Gly Gly Arg Tyr His Lys Leu Phe Asn Ser Tyr Gly
 545 550 555 560
 Phe Asn Gln Lys Ser Thr Tyr Ile Ser Met Glu Ser His Thr Ala Phe
 565 570 575
 35 Pro Thr Val Leu His Trp Leu Thr Ile Phe Ala Leu Gly Ser Asp Lys
 580 585 590
 Glu Thr Leu Asn Val Lys Ser Glu Lys Ser Cys Ser His Leu Gly Gln
 595 600 605

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Phe Gln Ala Met Tyr Thr Tyr Thr Trp Gln Pro Asn Pro Tyr Thr Gly
 610 615 620
 Asn Phe Ser Cys Leu Lys Ser Ala Ile Val Lys Lys Val Met Val Ser
 625 630 635 640
 Pro Ala Val Asp Ser Gln Thr Pro Glu Glu Glu Met Asn Thr Arg Tyr
 5 645 650 655
 Ser Thr Trp Met Glu Ser Val Tyr Ile Ile Glu Ser Val Asn Leu Tyr
 660 665 670
 Leu Met Glu Asp Ala Ser Phe Glu Tyr Thr Met Ile Leu Ile Ala Val
 675 680 685
 10 Ile Ser Ala Leu Leu Ser Ile Phe Ala Val Gly Arg Cys Ser Glu Thr
 690 695 700
 Thr Phe Ile Val Asp Glu Gly Glu Pro Ala Ala Glu Gly Gly Glu Pro
 705 710 715 720
 Leu
 15
 <210> 14
 <211> 708
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster
 20 <400> 14
 Ala Thr Ala Gly Gly Gly Ser Gly Ala Asp Pro Gly Ser Arg Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Leu Ser Phe Cys Val Leu Leu Ala Gly Leu Cys Arg Gly
 20 25 30
 25 Asn Ser Val Glu Arg Lys Ile Tyr Ile Pro Leu Asn Lys Thr Ala Pro
 35 40 45
 Cys Val Arg Leu Leu Asn Ala Thr His Gln Ile Gly Cys Gln Ser Ser
 50 55 60
 Ile Ser Gly Asp Thr Gly Val Ile His Val Val Glu Lys Glu Glu Asp
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Val Leu Thr Asp Gly Pro Asn Pro Pro Tyr Met Val Leu
 85 90 95
 Leu Glu Ser Lys His Phe Thr Arg Asp Leu Met Glu Lys Leu Lys Gly
 100 105 110
 35 Arg Thr Ser Arg Ile Ala Gly Leu Ala Val Ser Leu Thr Lys Pro Ser
 115 120 125
 Pro Ala Ser Gly Phe Ser Pro Ser Val Gln Cys Pro Asn Asp Gly Phe
 130 135 140

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Gly Val Tyr Ser Asn Ser Tyr Gly Pro Glu Phe Ala His Cys Arg Glu
 145 150 155 160
 Ile Gln Trp Asn Ser Leu Gly Asn Gly Leu Ala Tyr Glu Asp Phe Ser
 165 170 175
 Phe Pro Ile Phe Leu Leu Glu Asp Glu Asn Glu Thr Lys Val Ile Lys
 180 185 190
 Gln Cys Tyr Gln Asp His Asn Leu Ser Gln Asn Gly Ser Ala Pro Thr
 195 200 205
 Phe Pro Leu Cys Ala Met Gln Leu Phe Ser His Met His Ala Val Ile
 210 215 220
 Ser Thr Ala Thr Cys Met Arg Arg Ser Ser Ile Gln Ser Thr Phe Ser
 225 230 235 240
 Ile Asn Pro Glu Ile Val Cys Asp Pro Leu Ser Asp Tyr Asn Val Trp
 245 250 255
 Ser Met Leu Lys Pro Ile Asn Thr Thr Gly Thr Leu Lys Pro Asp Asp
 260 265 270
 Arg Val Val Val Ala Ala Thr Arg Leu Asp Ser Arg Ser Phe Phe Trp
 275 280 285
 Asn Val Ala Pro Gly Ala Glu Ser Ala Val Ala Ser Phe Val Thr Gln
 290 295 300
 Leu Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gln Lys Ala Pro Asp Val Thr Thr Leu
 305 310 315 320
 Pro Arg Asn Val Met Phe Val Phe Phe Gln Gly Glu Thr Phe Asp Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Ser Arg Met Val Tyr Asp Met Glu Lys Gly Lys Phe Pro
 340 345 350
 Val Gln Leu Glu Asn Val Asp Ser Phe Val Glu Leu Gly Gln Val Ala
 355 360 365
 Leu Arg Thr Ser Leu Glu Leu Trp Met His Thr Asp Pro Val Ser Gln
 370 375 380
 Lys Asn Glu Ser Val Arg Asn Gln Val Glu Asp Leu Leu Ala Thr Leu
 385 390 395 400
 Glu Lys Ser Gly Ala Gly Val Pro Ala Val Ile Leu Arg Arg Pro Asn
 405 410 415
 Gln Ser Gln Pro Leu Pro Pro Ser Ser Leu Gln Arg Phe Leu Arg Ala
 420 425 430
 Arg Asn Ile Ser Gly Val Val Leu Ala Asp His Ser Gly Ala Phe His
 435 440 445

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Asn Lys Tyr Tyr Gln Ser Ile Tyr Asp Thr Ala Glu Asn Ile Asn Val
 450 455 460
 Ser Tyr Pro Glu Trp Leu Ser Pro Glu Glu Asp Leu Asn Phe Val Thr
 465 470 475 480
 Asp Thr Ala Lys Ala Leu Ala Asp Val Ala Thr Val Leu Gly Arg Ala
 5 485 490 495
 Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Gly Thr Asn Phe Ser Asp Thr Val Gln Ala
 500 505 510
 Asp Pro Gln Thr Val Thr Arg Leu Leu Tyr Gly Phe Leu Ile Lys Ala
 515 520 525
 10 Asn Asn Ser Trp Phe Gln Ser Ile Leu Arg Gln Asp Leu Arg Ser Tyr
 530 535 540
 Leu Gly Asp Gly Pro Leu Gln His Tyr Ile Ala Val Ser Ser Pro Thr
 545 550 555 560
 Asn Thr Thr Tyr Val Val Gln Tyr Ala Leu Ala Asn Leu Thr Gly Thr
 15 565 570 575
 Val Val Asn Leu Thr Arg Glu Gln Cys Gln Asp Pro Ser Lys Val Pro
 580 585 590
 Ser Glu Asn Lys Asp Leu Tyr Glu Tyr Ser Trp Val Gln Gly Pro Leu
 595 600 605
 20 His Ser Asn Glu Thr Asp Arg Leu Pro Arg Cys Val Arg Ser Thr Ala
 610 615 620
 Arg Leu Ala Arg Ala Leu Ser Pro Ala Phe Glu Leu Ser Gln Trp Ser
 625 630 635 640
 Ser Thr Glu Tyr Ser Thr Trp Thr Glu Ser Arg Trp Lys Asp Ile Arg
 25 645 650 655
 Ala Arg Ile Phe Leu Ile Ala Ser Lys Glu Leu Glu Leu Ile Thr Leu
 660 665 670
 Thr Val Gly Phe Gly Ile Leu Ile Phe Ser Leu Ile Val Thr Tyr Cys
 675 680 685
 30 Ile Asn Ala Lys Ala Asp Val Leu Phe Ile Ala Pro Arg Glu Pro Gly
 690 695 700
 Ala Val Ser Tyr
 705
 35 <210> 15
 <211> 716
 <212> PRT
 <213> human

WO 01/85912

PCT/US01/14648

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

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Ser Trp Ser His Gly Leu Pro Tyr Gly Ile Cys Trp Phe Gln Leu Ser
 305 310 315 320
 Val Gly Tyr Leu Leu Lys Gln Leu Leu Pro Pro Gln Ser Lys Asp Leu
 325 330 335
 His Asn Val Leu Phe Val Thr Phe Asn Gly Glu Ser Tyr Asp Tyr Ile
 5 340 345 350
 Gly Ser Gln Arg Phe Val Tyr Asp Met Glu Lys Leu Gln Phe Pro Thr
 355 360 365
 Glu Ser Thr Gly Thr Pro Pro Ile Ala Phe Asp Asn Ile Asp Phe Met
 370 375 380
 10 Leu Asp Ile Gly Thr Leu Asp Asp Ile Ser Asn Ile Lys Leu His Ala
 385 390 395 400
 Leu Asn Gly Thr Thr Leu Ala Gln Gln Ile Leu Glu Arg Leu Asn Asn
 405 410 415

 15 Tyr Ala Lys Ser Pro Arg Tyr Gly Phe Asn Leu Asn Ile Gln Ser Glu
 420 425 430
 Met Ser Ala His Leu Pro Pro Thr Ser Ala Gln Ser Phe Leu Arg Arg
 435 440 445
 Asp Pro Asn Phe Asn Ala Leu Ile Leu Asn Ala Arg Pro Thr Asn Lys
 20 450 455 460
 Tyr Tyr His Ser Ile Tyr Asp Asp Ala Asp Asn Val Asp Phe Thr Tyr
 465 470 475 480
 Ala Asn Thr Ser Lys Asp Phe Thr Gln Leu Thr Glu Val Asn Asp Phe
 485 490 495
 25 Lys Ser Leu Asn Pro Asp Ser Leu Gln Met Lys Val Arg Asn Val Ser
 500 505 510
 Ser Ile Val Ala Met Ala Leu Tyr Gln Thr Ile Thr Gly Lys Glu Tyr
 515 520 525
 Thr Gly Thr Lys Val Ala Asn Pro Leu Met Ala Asp Glu Phe Leu Tyr
 30 530 535 540
 Cys Phe Leu Gln Ser Ala Asp Cys Pro Leu Phe Lys Ala Ala Ser Tyr
 545 550 555 560
 Pro Gly Ser Gln Leu Thr Asn Leu Pro Pro Met Arg Tyr Ile Ser Val
 565 570 575
 35 Leu Gly Gly Ser Gln Glu Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Arg Leu Leu Gly
 580 585 590
 Tyr Leu Leu Ser Gln Leu Gln Pro Asp Ile His Arg Asp Asn Cys Thr
 595 600 605

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Asp Leu Pro Leu His Tyr Phe Ala Gly Phe Asn Asn Ile Gly Glu Cys
 610 615 620
 Arg Leu Thr Thr Gln Asn Tyr Ser His Ala Leu Ser Pro Ala Phe Leu
 625 630 635 640
 5 Ile Asp Gly Tyr Asp Trp Ser Ser Gly Met Tyr Ser Thr Trp Ala Glu
 645 650 655
 Ser Thr Trp Ser Ser Gln Phe Ser Ala Arg Ile Phe Leu Arg Pro Ser Asn
 660 665 670
 Val His Gln Val Thr Thr Leu Ser Val Gly Ile Val Val Leu Ile Ile
 675 680 685
 10 Ser Phe Cys Leu Val Tyr Ile Ile Ser Ser Arg Ser Glu Val Leu Phe
 690 695 700
 Glu Asp Leu Pro Ala Ser Asn Ala Ala Leu Phe Gly
 705 710 715

 15 <210> 16
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 <400> 16
 Met Ala Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Ala Phe Asp Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 25 Ala Leu Ala Leu Tyr Glu Phe Thr Ile Ala Thr Glu Pro Leu Arg Phe
 20 25 30
 Ile Phe Leu Ile Ala Gly Ala Phe Phe Gly Leu Val Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Leu His Trp Phe Met Ala Arg Val Ile Ile Asp Ile Lys Asp
 30 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Lys Tyr Leu Lys Ile Phe Gly Ala Phe Val Ser Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Glu Met Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Met Leu Leu Lys Lys
 85 90 95
 35 Ala Ser Glu Gly Leu Asn Ser Ile Asn Pro Gly Glu Thr Ala Pro Gln
 100 105 110
 Met Arg Leu Leu Ala Tyr Val Ser Gly Arg Gly Phe Gly Ile Met Ser
 115 120 125

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Gly Val Phe Thr Phe Val Asn Thr Leu Ser Asp Ser Leu Val Pro Gly
 130 135 140
 Thr Val Gly Ile His Gly Asp Trp Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Ser Ala
 145 150 155 160
 Phe Tyr Thr Leu Val Ile Ile Leu Leu His Val Ala Trp Gly Ile Val
 5 165 170 175
 Phe Phe Asp Gly Cys Asp Lys Lys Lys Trp Gly Ile Leu Leu Ile Glu
 180 185 190
 Leu Leu Thr His Leu Leu Val Ser Ala Phe Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 10 Tyr Gly Ile Gly Leu Ala Ser Ala Phe Ile Ile Leu Val His Met Gly
 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Leu Ala Ala Ile Gly Ser Cys Arg Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Lys Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Leu Asn Gln Arg Ser
 15 245 250 255
 Arg

 <210> 17
 <211> 257
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 25 <400> 17
 Met Thr Asp Ala Val Phe Phe Gly Cys Ala Phe Ile Glu Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Leu Tyr Val Gly Thr Ile Ala Thr Glu Pro Leu Arg Ile
 20 25 30
 30 His Phe Leu Ile Ala Gly Ala Phe Phe Trp Ile Val Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Leu Val Lys Phe Met Ala Arg Val Ile Ile Asp Asn Leu Asp
 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Lys Tyr Leu Leu Met Phe Gly Ala Phe Val Ser Val
 65 70 75 80
 35 Tyr Ile Asn Glu Met Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Gln Leu Lys Lys
 85 90 95
 Ala Ser Glu Gly Leu Lys Arg Ile Asn Pro Gly Glu Thr Ala Pro Ser

WO 01/85912 PCT/US01/14648

100 105 110
 Ser Arg Leu Leu Ala Tyr Val Ser Gly Leu Thr Phe Gly Ile Met Ser
 115 120 125
 Gly Val Phe Ser Val Val Asn Thr Leu Ser Asp Ser Leu Gly Trp Gly
 130 135 140
 5 Thr Val Gly Ile His Gly Asp Ser Tyr Gln Phe Phe Leu Tyr Ser Ala
 145 150 155 160
 Phe Met Ala Leu Val Ile Ile Leu Leu His Val Phe Asp Gly Ile Val
 165 170 175
 10 Phe Phe Asp Gly Cys Glu Glu Lys Lys Trp Gly Ile Leu Leu Ile Val
 180 185 190
 Phe Leu Thr His Leu Leu Val Ser Ala Gln Gly Phe Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn His Ala Ser Ala Phe Ile Ile Leu Val Leu Ile Gly
 210 215 220
 15 Thr Trp Ala Phe Leu Ala Ala Gly Lys Ser Cys Arg Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Met Cys Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Gln Gln Arg Ser
 245 250 255
 Arg
 20
 <210> 18
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 <400> 18
 Met Thr Ala Asp Val Phe Phe Gly Cys Ala Phe Ile Ala Glu Gly Pro
 30 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Leu Tyr Val Phe Phe Ile Ala Thr Glu Pro Leu Arg Ile
 20 25 30
 Ile Gly Leu Ile Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu His Ser Leu Leu Ile
 35 35 40 45
 Ser Ser Leu Val Trp Ile Met Ala Arg Val Ile Ile Asp Asn Lys Lys
 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Lys Tyr Leu Leu Ile Leu Gly Ala Phe Val Ser Val
 65 70 75 80

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Ile Phe Leu Phe Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Gly Leu Ile
 35 40 45
 Ser Ser Leu Val Trp Phe Met His Arg Val Ile Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60
 Gly Ile Thr Gln Lys Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Lys Phe Val Ser Val
 5 65 70 75 80
 Tyr Ile Gln Glu Met Leu Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Met
 85 90 95
 Ala Ser Glu Gly Leu Lys Ser Ile Asn Asn Gly Glu Thr Ala Pro Ser
 100 105 110
 10 Met Arg Leu Gln Ala Tyr Val Ser Gly Leu Gly Phe Gly Arg Met Ser
 115 120 125
 Gly Val Phe Ser Phe Val Asn Ser Leu Ser Asp Ser Leu Gly Pro Gly
 130 135 140
 Thr Thr Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Gln Phe Val Leu Tyr Ser Ala
 15 145 150 155 160
 Phe Met Thr Leu Val Trp Ile Leu Leu His Val Phe Trp Gly Ile Tyr
 165 170 175
 Phe Phe Asp Gly Cys Glu Lys Lys Lys Ala Gly Ile Leu Leu Ile Val
 180 185 190
 20 Leu Leu Thr Asp Leu Leu Val Ser Ala Gln Thr Phe Ile Glu Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Ser Phe Phe Ile Ile Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 Thr Gly Ala Phe Leu Ala Ala Gly Gly Ser Cys His Ser Leu Lys Leu
 25 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Ile Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Lys
 245 250 255
 Arg
 30 <210> 21
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 <400> 21
 Met Thr Ala Ala Val Phe Ala Gly Cys Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

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

<210> 22
<211> 257
35 <212> PRT
    <213> Artificial Sequence
    <220>
    <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Sequence

<400> 22

Met Thr Ala Ala Val Phe Phe Ala Cys Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15

Ala Asp Ala Leu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Thr Phe Pro Leu Arg Ile
 5 20 25 30

Ile Phe Leu Ile Ala His Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Lys
 35 40 45

Ser Ser Leu Val Trp Phe Met Ala Arg Leu Ile Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60

10 Gly Pro Thr Met Lys Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Ala Phe Asn Ser Val
 65 70 75 80

Tyr Ile Gln Glu Met Phe Arg Gln Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Leu Lys Ser Ile Asn Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ser
 15 100 105 110

Met Arg Leu Leu Ala Thr Val Ser Gly Leu Gly Phe Gly Ile Met Val
 115 120 125

Gly Val Phe Ser Phe Val Asn Thr Leu Trp Asp Ser Leu Gly Pro Gly
 130 135 140

20 Thr Val Gly Tyr His Gly Asp Ser Pro Gln Phe Phe Leu Ala Ser Ala
 145 150 155 160

Phe Met Thr Leu Val Ile Ile Asp Leu His Val Phe Trp Gly Ile Val
 165 170 175

Phe Glu Asp Gly Cys Glu Lys Lys Lys Trp Gly Phe Leu Leu Ile Val
 25 180 185 190

Leu Leu Thr His Leu Gly Val Ser Ala Gln Thr Phe Ile Ser Ser His
 195 200 205

Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Lys Ile Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220

30 Thr Trp Ala Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Met Lys Leu
 225 230 235 240

Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Gln Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

35

<210> 23
 <211> 257
 <212> PRT

WO 01/85912

PCT/US01/14648

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 <400> 23
 5 Met Thr Ala Ala Val Phe Phe Gly Ala Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Asp Leu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Thr Glu Glu Leu Arg Ile
 20 25 30
 Ile Phe Leu Ile Ala Gly Phe Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Ile
 10 35 40 45
 Gly Ser Leu Val Trp Phe Met Ala Arg Val His Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Ile Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Ala Phe Val Lys Val
 65 70 75 80
 15 Tyr Ile Gln Glu Met Phe Arg Phe Leu Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
 85 90 95
 Ala Ser Met Gly Leu Lys Ser Ile Asn Pro Gly Glu Asn Ala Pro Ser
 100 105 110
 Met Arg Leu Leu Ala Tyr Gln Ser Gly Leu Gly Phe Gly Ile Met Ser
 20 115 120 125
 Arg Val Phe Ser Phe Val Asn Thr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Pro Gly
 130 135 140
 Thr Val Gly Ile Thr Gly Asp Ser Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Val Ala
 145 150 155 160
 25 Phe Met Thr Leu Val Ile Ile Leu Trp His Val Phe Trp Gly Ile Val
 165 170 175
 Phe Phe Tyr Gly Cys Glu Lys Lys Lys Trp Gly Ile Ala Leu Ile Val
 180 185 190
 Leu Leu Thr His Leu Leu Asp Ser Ala Gln Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
 30 195 200 205
 Glu Gly Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Ile Phe Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Gly Ala Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Leu His Leu
 225 230 235 240
 35 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Ile Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255
 Arg

WO 01/85912

PCT/US01/14648

<210> 24
 <211> 257
 <212> FRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence
 <400> 24
 Met Thr Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Asp Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 10 Ala Leu Ala Glu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Thr Glu Pro Phe Arg Ile
 20 25 30
 Ile Phe Leu Ile Ala Gly Ala Gly Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ser His Leu Val Trp Phe Met Ala Arg Val Ile Lys Asp Asn Lys Asp
 15 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Lys Leu Leu Ile Phe Gly Ala Phe Val Ser Met
 65 70 75 80
 Tyr Ile Gln Glu Met Phe Arg Phe Ala Asn Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
 85 90 95
 20 Ala Ser Glu Gln Leu Lys Ser Ile Asn Pro Gly Glu Thr Arg Pro Ser
 100 105 110
 Met Arg Leu Leu Ala Tyr Val Thr Gly Leu Gly Phe Gly Ile Met Ser
 115 120 125
 Gly Trp Phe Ser Phe Val Asn Thr Leu Ser Asp Tyr Leu Gly Pro Gly
 25 130 135 140
 Thr Val Gly Ile His Ala Asp Ser Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Ser Asp
 145 150 155 160
 Phe Met Thr Leu Val Ile Ile Leu Leu Glu Val Phe Trp Gly Ile Val
 165 170 175
 30 Phe Phe Asp Phe Cys Glu Lys Lys Lys Trp Gly Ile Leu Gly Ile Val
 180 185 190
 Leu Leu Thr His Leu Leu Val His Ala Gln Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Ile Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Ile Ile Lys Val Leu Met Gly
 35 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Leu Leu Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Leu Lys Met
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Asn Leu Tyr Asn Gln Arg Ser

WO 01/85912

PCT/US01/14648

245 250 255

Arg

<210> 25
 <211> 925
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

10 <400> 25
 Gly Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Thr
 20 25 30
 15 Thr Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys
 35 40 45
 Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr
 50 55 60
 Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala
 20 65 70 75 80
 Cys Cys Gly Ala Gly Cys Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Ala Thr
 85 90 95
 Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys
 100 105 110
 25 Gly Gly Ala Gly Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr
 115 120 125
 Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr
 130 135 140
 Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr Thr Gly Gly
 30 145 150 155 160
 Thr Thr Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala
 165 170 175
 Thr Thr Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Ala
 180 185 190
 35 Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala
 195 200 205
 Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly
 210 215 220

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Gly Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr
 225 230 235 240
 Cys Thr Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly
 245 250 255
 Thr Thr Cys Cys Gly Ala Thr Thr Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Thr
 5 260 265 270
 Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 275 280 285
 Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Thr Thr Gly
 290 295 300
 10 Ala Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Gly
 305 310 315 320
 Gly Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys
 325 330 335
 Thr Ala Thr Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys
 15 340 345 350
 Thr Ala Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly
 355 360 365
 Gly Cys Thr Thr Thr Gly Gly Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala Gly
 370 375 380
 20 Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr
 385 390 395 400
 Gly Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly
 405 410 415
 Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly
 25 420 425 430
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Ala Thr
 435 440 445
 Gly Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Ala Thr
 450 455 460
 30 Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Gly Cys
 465 470 475 480
 Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys
 485 490 495
 Ala Thr Thr Ala Thr Cys Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Gly
 35 500 505 510
 Thr Ala Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr
 515 520 525
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr

WO 01/85912

PCT/US01/14648

530 535 540
 Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Thr
 565 570 575
 5 Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Thr Gly
 580 585 590
 Cys Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala
 595 600 605
 Cys Cys Thr Thr Cys Ala Thr Ala Ala Gly Thr Thr Thr Thr Ala
 10 610 615 620
 Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly
 625 630 635 640
 Gly Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala
 645 650 655
 15 Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly
 660 665 670
 Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Thr Thr Ala
 675 680 685
 Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr
 20 690 695 700
 Gly Cys Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr
 705 710 715 720
 Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala
 725 730 735
 25 Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys
 740 745 750
 Thr Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Thr Cys
 755 760 765
 Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 30 770 775 780
 Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala
 785 790 795 800
 Cys Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr
 805 810 815
 35 Thr Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Thr
 820 825 830
 Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala
 835 840 845

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Ala Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly
850 855 860
Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr
865 870 875 880
Ala Ala Ala Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr
5 885 890 895
Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
900 905 910
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
915 920 925

10
<210> 26
<211> 925
<212> DNA
<213> human

15
<400> 26
gatgactgcg ggcgtgttct tgggctgccc cttcattgcc ttcgggcctg cgctgcacct 60
ttatgtcttc aocatcgcca ccgagccgtt gcgtatcacc ttctcatcg ccggaagtct 120
cttctggttg gtgtctctac tgatttcgtc ccttgtttgg ttcattggca gactcattat 180
tgacaacaaa gatggaccaa cacagaata totgctgacc ttggagcgt ttgtctctgt 240
20 ctatatccaa gaaatgttcc gatttcata ttataaactc ttaaaaaaag ccagtgaagc 300
tttgaagagt ataaaccag gtgagacagc acctctatg cgaactgtgg cctatgttcc 360
tggcttgggc ttggaaatca tgagtggagt atttctcttt gtgaatacc tatctgactc 420
cttggggcca ggcacagtgg gcattcatgg agattctctc caattcttcc tttattcagc 480
tttcatgacg ctggtcatta tcttgctgca tgtattctgg ggcattgtat tttttgatgg 540
25 ctgtgagaag aaaaagtggg gcatcctcct tatcgttctc ctgaccacc tgcgtggtgc 600
agcccagacc ttcataagtt cttattatgg aataaactcg gcgtcagcat ttataatcct 660
ggtgctcatg ggcacctggg cattcttagc tgcgggaggg agctgccgaa gcctgaaact 720
ctgcctgctc tgccaagaca agaactttct tctttacaac cagcgtccca gataacctca 780
gggaaccagc acttcccaaa ccgcagacta catctttaga ggaagcacia ctgtgacctt 840
30 ttctgaaat cctttttct ggtggaattg agaagaaat aaaactatgc agatattcgt 900
tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 925

<210> 27
<211> 925
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

WO 01/85912

PCT/US01/14648

Sequence

<400> 27
 gatgacagcg gccgttttct tcgggtgcgc cttgattgcc ttaggcctg ctctgcct 60
 ctatgtcttg accatcgcaa ccgagccttt gcgtatcctc ttctgatcg ccggagcttt 120
 cttttggttg gtctctctac tgatttctgc acttgtttgt ttcattggca gactcatgat 180
 5 tgacaaaaaa gatggtccaa cacacaaata tctgctgatc ttaggagcgt ttgtctctgt 240
 ctatatccag gaaatgttac gatttgctta ttataacctc ttaagaaaag ccagagaagg 300
 ttttaagagt atcaaccag gggagacagc acctctattc cgaactctcg cctatgtctc 360
 tggcttaggc tttggtatca tgagggaggt attgtccttt gtaataaccg tgcctgactc 420
 cttggggcgc ggcacagtag gcattccagg agattcccct caattgttcc tttaatcagc 480
 10 ttttatgacg ctgctcatta tgttctgca agtattctgt ggcattgtct tttttgagg 540
 ctgtgaaaag aaaaattggg gcattcctctc tatggtcttc ctaaccaccg tctctggtgc 600
 cccccagagc ttcataagat cttattatgc aataaacctg gcgtcgccat ttataactc 660
 ggttctcatg ggcacctggg cgttcttagc agcgggaggt agctgccgca gcctgaaagt 720
 ctgcctactc tgccatgaca agaactttct tctgtacaac caacgctcca gttaacctca 780
 15 cggaccagcg acttcccaaa ccgagatta catcttcaga ggaaggacaa ctgtaccctt 840
 ttctgaaaat cctttttctt ggtggaattg agaaagaaat aaaactatcc agataggg 900
 tccaaaaaaa aaaaataaaa aaac 925

<210> 28

20 <211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

25 Sequence

<400> 28
 gatgaactgc gccgtcttct tcgggtgcgc ctttaattgcc ttgggcctg cctctgcct 60
 gtatgtctta accatcgcta ccgagccctt gcgtatgata ttctaatcg ccgggtgctt 120
 cttctggttg gtgtctctac taatttctgc tcttgtttgc ttcattggca gactcataat 180
 30 tgacaataaa gatggcccaa cacagaaata tctactgata ttggagcgt tctctctctg 240
 gtatatccaa gaaatgttct gatttgccta ttataagctc ttaaaaaaag ccagtgaagg 300
 tttcaagagt atgaaccag gagagacagc tccctctatc cgaactgtgg cctatgtatc 360
 tggctttggc tttggcatca tgagggaggt attatccttt gttaataccg tctctgactc 420
 gttggggcca ggcacagttg gcattccagc agattcgctt caattattcc tttatcagc 480
 35 tttcatgacg ctggtcatta tattgtctga tgtattctgc ggcattgtgt tttttgagg 540
 ctgtgataag aaaaactggg gcattcctctc tatagttctc cttaccaccg cctgggtgtc 600
 gggccagaca ttcataagtt cttattcagg aataaagctg gcgtcagcat ttattatcct 660
 ggtctctatg gggacctggg cattcttagc tgogggagcc agctgcogga gcctgaaact 720

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

ctgcctctc tgccaacgaca agaagtttct tctatacaac catcgctcca gctaacctca 780
gggaaccaga acttcccata ccgacagacta catcttgaga ggaagaacaa ctgttccttt 840
ttccgaaaaat ccgtttttct gatggaattg tgaagaaac aaaactatgc agatatgagt 900
tccaaataaa aaaaacaaaa aaaag                                     925

```

```

5  <210> 29
   <211> 925
   <212> DNA
   <213> Artificial Sequence
   <220>
10 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
    Sequence
   <400> 29
gatgaccgcg gccgtgttct tcggatgcgc ctttattgcc ttggggcctg cgtcgcct 60
atatgtcttt accatcgcca ccgagccggt gcgtataatc ttccttatcg ccggcgcttt 120
15 cttgtggttg gtatctctac ttatttcgtc ccttgtttgg ttcatggcaa gagtcatat 180
tgacaacaaa gatgggcaa cacaaaata tcttctgac ttccggagcgt tggctctgt 240
atatatccat gaaatgttcc gatttgcgta ttataaactc ttaataaag ccagcgaagg 300
tttgaagagt ataaaccag gtgagacagc cccctctatg cgaactgtag cctatgtttc 360
tggcttggc tttgggatca tgagaggagt atttcccttt gccaataacc tgtctgactc 420
20 attggggcct ggcacagtcg gcattcaggg agattcacct caattttcc tttactcagc 480
tttcatgacg ctagtcatca ttttgcgca cgtattctgg ggcattgtat tttttgatgg 540
ctgtgacaag aaaaagtggg gcatactcct tattgtctc ctcaccacc tgcctggtgc 600
agcccagact ttcataagct cttattaggg aataaaactg gcgtctgcat ttatcatct 660
ggtgctcatg ggaacctggg ctttcttagc cgcgggaggg agctgccgaa gcctgaact 720
25 ctgcctctc tgccaggaca agaaatttct tctttacaac caccgctcca ggtaacctca 780
aggaaccagt acttcccaca ccgacagta catcttaaga ggaagtacaa ctgtcccttt 840
ttccgaaaaat ccatttttct gttggaattg cgaagaaag aaaactatac agatatgagt 900
tccaaacaaa aaaaagaaaa aaaaa                                     925

30 <210> 30
   <211> 925
   <212> DNA
   <213> Artificial Sequence
   <220>
35 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
    Sequence
   <400> 30
gatgaccgcg gccgtattct tcggttgcgc cttcattgcc ttggggcctg cactcgcct 60

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

ttatgtcttc accatcgoga ccgagccatt gogtattatc ttcctcatcg ccggggcttt 120
cttatgggtg gtttctctac tcatttcgtc gottgittga ttcattggcta gagtcatcat 180
tgacaagaaa gatggacca cacataaata tctcctgac tggggagcgt tagtctctgt 240
ttatatccac gaaatgttgc gatttgata ttataatctc ttaacaacag ccaggggaagg 300
tttaagagat attaaccag gcgagacago gccctctata cgaactgctg cctatgtctc 360
5  tggcttgggc ttggaatca tgagtggagt attctccttt gtgaataccc tatctgactc 420
tttggggccc ggcacagtgg gcattcaagg agattctcct caattcttcc tttagtcaag 480
ttaatgaag cttgtcatta tcttctgca ggtattctga ggcattgttt tttttgacgg 540
ctgtgagaag aaaaaatggg gcattctcct tatcgtcttc ctgacccaac tactggtgtc 600
tgcccagacc ttcataaggt ottattaagg aataaactcg gcgtccgcat ttatgatcct 660
10 ggtactcatg ggtacctggg ccttcttagc ggcgggagga agctgccga gccctgaact 720
ctgctgctc tgccaagaca agaattttct tctctacaac cagcctcca gataacctca 780
tggaaccagc acttcccaga ccgagaata catctttaga ggaagcaaa ctgtgacctt 840
ttcagaaaaat ccttttctct gctggaattg ggaagaaaa aaaactattc agatatgcgt 900
tccaaagaaa aaaaaaaaa aaat 925
15
<210> 31
<211> 925
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence
<400> 31
gatgaactgca gccgtgtttt tccggtgcgc cttcatggcc ttccgacctg csettgccct 60
25  ttacgtcttc acgatcgcca cagagccggt tcgtatcacc ttcctcatgg ccggagcatt 120
cttctgtttg gtgtccctac tgatgtcgtc cctagtttgg tttatggcaa gcgtcattat 180
ggacaacaaa gatggacctc cacagaacta tctgtctgac tttggagcgt ttgtttctgt 240
ctacatccaa gagatgttcc gatttgata ttataaactc ttaaaaaagg ccagtgaagg 300
tttgaatagt ataaaccag gtgagacagc accatctatg cgtctgctgg cctatgttcc 360
30  gggcttggga ttggaatta tgagtggcgt atttcgttt gtgaaaacc cctatgactc 420
cttcgggcca gggacagtgg gaattcatgg tgattctccc caattcttgc tttattcagc 480
tttcattacg ctggtcatta tcttctgca tgattctbgy ggtattgtat cctttgatgg 540
gtgtgagaaa aaaaagtgtg gcactcctct tatcgtgctc ctgacacaac tgettggtgc 600
agcccagacc ttgataagtt catattatgg tataaacctc gcgtcagcgt ttataaact 660
35  ggtgottatg gccacctggg cattgttagc tgcaggagc agttgccgaa gccctgaaact 720
gtgcctgcta tgccaagata agaacttctc tctttagaac cagcgtacca gatacctca 780
gggcaccagc acgtcccaaa cagcagacta tatctttagc ggaagcaag ctgtgacctt 840
ttctgataat ccttctctct ggtggaattg agaagaaat aatactatgc acatagcgt 900

```

WO 01/85912 PCT/US01/14648

gccccaaaaa aaaaaaaaaata aaaaa 925

<210> 32
<211> 925
<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 32
10 gatgactgct gccgtgttct tcggctgggc ctteatagcc ttcggctcctg cgetcgcct 60
ttaggtottc acaatcgcca ctgagccgtt ccgtatcatg ttccatag cggagottt 120
cttctgttg gtgtcgctac tgatctgtc cctgttttg ttcattgcaa gggcattat 180
agacaacaat gatggaccca cacagaagta tctgctaac tttgggtcgt ttgtctctgt 240
ctagatccaa gaaatgttcc gttttgcata ctataaactg ttaaaaaaag ccagtgatgg 300
15 ttgaaacgt ataaaagccag gtgaaacagc acctotatg cgcctgctgg cgtatgttc 360
aggcttgggt tttggaatca tgagtgggtt attttcattt gtgaataccc tatccgactc 420
cttggggcca ggaacagtg gtattcatgg cgtttctcc caattottac ttattctgc 480
tttcatcag ctggtgatta tcttactgca tgtttctgg ggcattgtat tgtttgatgg 540
atgtggaat aaaaagtgcg gcatcctgct tctgtactc ctgactcacc tgctcgtgtc 600
20 agcgcagacc ttaataagtt cttattatgg cataaacctg gcgtcagcat ttataattct 660
ggtgtcatg ggcacgtggg cattattagc tgctggaggc agctgcgaa ggtgaaact 720
atgctgctt tgccaagaca agaacttgc tctttaaacc cagcgttcca gataccctca 780
ggggaccagc acatcccaaa ctgcagacta catctttagg ggaagcacia cgtgccttt 840
ttctgacaat ccctgttct ggtgaaattg agatagaat aacactatgc agatagcgt 900
25 acccaaaaat aaaaaaaca aaaaa 925

<210> 33
<211> 925
<212> DNA

30 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 33
35 gatgactgcc gccgtgttct tcggctgggc ctteattgccc ttggccctg cgtggcct 60
ttaagtcttc actatcgcca ccgagccgtt ccgtatcata ttctcattg ccggagcctt 120
cttctgggtg gtgtcactac tgattctgtc cctcgttttg ttgatggcaa gactcattat 180
tgacaacaac gatggaccga cacagaata tctgtttatc tttggcgtt ttgtctctgt 240

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

ctaaatccaa gatatgttcc gctttgcata gtataaacta ttaaaaaatg ccagtgaogg 300
tttgaagagt ataaaaccag gtgatacagc accctctatg cggctgctgg catatgttcc 360
tggcttgggc tttggaatga tgagtggagt attttctttt gtgaacaccc tatcggacto 420
cttagggcca ggtacagtgg gcattcatgg ggattctcca caattcttcc tttattccgc 480
tttcatgacg ctggtaatta tctttctgca tgtcttctgg gggattgtat tttttgatgg 540
5 tttgagaac aaaaagtggg gcattcctact tatcgtctc ctgacccacc tgctgggtgc 600
agcacagacc tttataagtt cctattatgg gataaaccta gcgtcagctt ttataatcct 660
ggctctgatg ggcacatggg catttttagc tgccggaggc aggtgccgaa gactgaaact 720
ttgctgctc tgccaagaga agaacttact tctttataac cagcgtccca gatagcctca 780
gggaaccagc acctcccaaa cgcagacta gatctttaga ggaagcacta ctgtgccctt 840
10 tcttgagaat ccttattctt ggtgcaattg agacagaaat aagactatgc aatatgcgt 900
tccaaaaaac aaaaaaaaaa aaaaa 925

```

```

<210> 34
<211> 925
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

```

```

20 <400> 34
gatgaactgog gccgtgttat tccgctgtgc ctccatcgcc ttcgggcctg cgotagccct 60
ttatgtcttc accatcgcca cggagccggt acgtatcatt ttccctatcg ccggagcgtt 120
cttctgatgt gtgtctctac tgatctctgc cctggtttgg ttaatggcaa gtgtcattat 180
cgacaacaag gatggacca cacagaatta tctgctcact tttggggcgt ttgtatctgt 240
25 ctatatccaa gacatgttcc ggtttgcata atataaactt ttaaaaaacg ccagtgaagg 300
tttgaaaagt ataaatccag gtgacacagc accgtctatg cgaactctgg cttatgttcc 360
cggcttgggg tttggaataa tgagtgggtt attttccctt gtgaagaccc taccagactc 420
ctttgggcca ggcacagtgg ggattcatgg agattctcct caattcttcc tttattccgc 480
tttcataaag ctggttatta tcttctgca tgtgttctgg ggaattgtat tttttgatgg 540
30 ctgtgagaag aaaaagttag gcattcctct tatcgtctc ctgaogcacc tgctagtgtc 600
agctcagaac ttcataagtt cgtattatgg aataaacctt gcgtcagcct ttataatgct 660
ggtgctaagt ggcacttggg cattcttagc tgccggaggc agatgccgaa gtctgaaact 720
ctgctgctg tgccaagaaa agaactttct tctttacaac cagcgtccca gataacctca 780
gggtaccagc acctcccaaa cgcagacta aatctttagt ggaagcacca ctgtgccgtt 840
35 tctgaaaaat ccttctttct ggtgcaattg agagagaaat aaaactatgc aatatgcgt 900
ccccaaaag aaaaaaaaaa aaaaa 925

```

<210> 35

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

<211> 925
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
5
Sequence
<400> 35
gatgactgcg gcagtggttct ttggctgccc cttcattgcg ttggggccag cgctcgctct 60
ttatgtcttc accatggcca ccgaaccggt gcgtatcctc ttcctcatcg cgggagcttt 120
attctgggtt gtgtctctcc tgatttctgc ccttgatggt ttcattgcaa gagtattat 180
10
tgagaacaaa gaaggaccaa ctacagaata cctgctgatg ttgggagcat ttgtctctgt 240
ctatatccaa gaaatgttcc gattagcata ttataaactc ttcaaaaag cgagtgaagg 300
attgaagagt ataaaccccg gtgagacggc accctcaatg cgacttctgg cctacgtttc 360
tgggttgggc ttaggatca ttagtggagt cttttccttg gtgaatacac tatctgattc 420
cttgggcccc ggcacggtgg gcatacatgg agattctctc cacttcttcc tgtattcagc 480
15
attcatgact ctggtcatca tcttctgcca tgtattatgg ggcattgtat tttctgatgg 540
ctgggagaag aaaaagtggg gtatctctct catggtctgt ctgacccaac tgctgggttc 600
agcccaaccc ttcattgagtt ctaatatgg aattaacctg gcctcagcat tgataatctc 660
agtctcatt ggcacctgcy cattcttggc tgcgggaggc agctgtcgaa gcctcaaac 720
ctggtctgct tgacaagaca ataactttct cctttacaag cagcgtcaa gataacctca 780
20
gggaaccagc acttcgcaa cgcagacta cttttttaga ggcagacaaa cggtcctttt 840
atctgaaaat ccttttttct ggtggaagtg agaaagaaat aaaactatgc agatctgcgt 900
tccgaaaaaa aaaaaaaaaa ataaa 925

<210> 36
25
<211> 925
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
30
Sequence
<400> 36
gatgactgcg gctgtgttct tcggctgccc gttcattgca ttggggcctg cgctcgccct 60
ttatgtgttc accatagcca ccgacccggt gcgcacatc ttgctcatcg caggagcttt 120
tttctgggtc gtgtctctgc tgatttctgc ccttggttgg ttcacgcaa gagtattat 180
35
tgaaaaaaa gatggaccaa ccagaaata gctgctgata ttggagctt ttgtctcgt 240
ctatatgcaa gaaatattcc gatttgcata ttacaaactc ttgaaaaaag caagtgaagg 300
tttgaagagc ataaaccccg gtgagacagc accctctatg cgactcctgg cctagggttc 360
tggattgggc tttggaatca tcagtggagt gtttcctta gtgaatactc tatctgactc 420

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

```

cttggggcca ggcacagtgg gcattcatgg agactctcct cagttcttcc tatattcagc 480
tttcatgacc ctggctcatga tcttgtctaca tgtattttgg ggcacatgat ttttggatgg 540
ctggagagaag aataagtggg gcacacctct gatogtteta ctgaccatc tgctggcttc 600
agcccagacc ttcataagtt cttattatgg aatcaacctg gcgtcagcat taataatcct 660
5  tgtgctcacc ggcacctggg cattcttagc tgcgggtggc agctgccgaa gcctgaaact 720
ctgactgctc tgtcaagaca acaactttct gctttacaaa cagcgctcta gataacocca 780
gggaacgagc acttcacaaa ccgctgacta catctttaga gggagcacia cagtgccttt 840
ttctgaaaac ccctttttgt ggtggaattg agaaagtaat aaaacctgc agatgtcgt 900
tccaaaaaaa aataaaaaaa acaaaa 925

10 <210> 37
    <211> 925
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

15 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
    Sequence
    <400> 37
gatgactgcg gccgtgttct tgggctgccc attcattgct ttcgggcccg cgtctgcgct 60
ttatgtattc accattgcaa ccgaccctgt gcggatcacc ttaactatcg ctggagcttt 120
20  cttctggttg gtgtctctac tgatttcttc ccttgtctgg ttcattgcaa gaggtaattt 180
tgataacaaa gacggaccaa ccgagaaata actgctgatt tttggagcct ttgtctcggt 240
ctatatacaa gaaattttcc gattcgcata ttgaaactc ttaaaaaaag ctagtgaagg 300
cttgaagagg ataaaccacg gtgagactgc accctccatg cgaactgctg cctaagtttc 360
tgggtttggc ttcggaatca tgagtggagt attttccttt gtgaataacc tatctgagtc 420
25  cttgggacca ggcactgtgg gcacccatgg agactctcct caattcttc tttattcagc 480
cttcatgacg ctggctataa tcttcttca tgtattctgg ggcattggtat ttttagatgg 540
ctgtgagaag aacaagtggg ggcacctcct aatcgttctt ctgaccacc tgctggcttc 600
agcccaaac ttcattagtt cttactatgg aatgaacctg gcactcagcat ttataatcct 660
cgtgctcatg ggcacctgag cattctttgc tgcggggggc agctggcgaa gcctaaaaact 720
30  ctgtctgctc tgccaagaca agaactttct actttacaat cagcgctcca gataaccgca 780
gggaacaagc acttctcaaa ccgccgacta catgtttaga ggaagcacia ctgtgccttt 840
ctctgaaaag ccctttttat ggtggaattg agaaagcaat aaaacgatgc agatgtcgt 900
tcttaaaaaa acaaaaaaaa agaaa 925

35 <210> 38
    <211> 925
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

```

WO 01/85912

PCT/US01/14648

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 38

```
gatgactgcg ggggtgttct taggctgccc ttccattgcc ttggggcogg cgctcgcact 60
5  ttatgttttc accatcgcca ccgagccgtt gcgaatcacc ttctctatcg ccggagcttt 120
gttctgggta gtgtctcttc tgatttcttc ccttggtggtg ttcatagcaa gagttattat 180
tgacaacaaa gagggaccaa cacagaaata tctgtgtatc ttgggagcgt ttgtctcagt 240
ctatattcaa gaaatcttcc gattggcata ttaaaaactc ttaaaaaag ccagtgaagg 300
gttgaagaga ataaaccctg gtgagaccgc accctgatg cgactactgg cctatgtttc 360
10  tggcttgggc ttgggaatca taagtggagt ttttcccttc gtgaatacgc tatctgaatc 420
cttgggtcca ggcaccgtgg gcattgcattg agaatctcct cattcttcc tctattcagc 480
gttcatgaca ctggtcatta tcttgcacca tgtattgtgg ggcatagtat tttttgatgg 540
ctgcgagaag aagaagtggg gaatcctcct tatcgttctc ctgaccacgc tgctggatc 600
agcccatacc ttcateagtt cttagtatgg aataaacctg gcttcagcat tcataatcct 660
15  ggtgctcata ggcacctgtg cattcttctc tgoggggggc agctgacgaa gccttaaac 720
ctgctgctc tggcaagaca aaaactttot tctttacaac cagcgcctga gataaccaca 780
gggaactagc acttcccaa ccgoggacta catatttaga ggtagcacia ccgtgccttt 840
gtctgaaaaa cctttttttt ggtggaactg agaaaggaat aaaacaatgc agatttgct 900
tcccaaaaaa aagaaaaaaa aaaaa 925
```

【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
15 November 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/085912 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53** 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/14648
- (22) International Filing Date: 3 May 2001 (03.05.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/568,942 5 May 2000 (05.05.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **EX-ELIXIS, INC.** [US/US]; 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **CURTIS, Daniel, Tim** [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). **FRANCIS, George, Ross** [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). **ELLIS, Michael, Christopher** [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). **RUDDY, David, Andrew** [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). **NICOLL, Sharon, Monique** [US/US]; Exelixis, Inc., 170 Harbor Way, P.O. Box 511, South San Francisco, CA 94083-0511 (US). **MCGRATH, Garth, Joseph** [US/US]; Exelixis, Inc.,
- (74) Agent: **OSMAN, Richard, Aron**; Science & Technology Law Group, 75 Demise Drive, Hillborough, CA 94010 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
31 July 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 01/085912 A3

(54) Title: PRESILIN ENHANCERS

(57) Abstract: The invention provides methods and compositions relating to pen polypeptides having pen-specific structure and activity, related polynucleotides and modulators of pen function. The invention provides isolated pen hybridization probes and primers capable of specifically hybridizing with natural pen genes, pen-specific binding agents such as specific antibodies, and methods of making and using the subject compositions in diagnosis (e.g. genetic hybridization screens for pen transcripts), therapy (e.g. pen inhibitors to modulate APP processing) and in the biopharmaceutical industry (e.g. as immunogens, reagents for screening chemical libraries for lead pharmacological agents, etc.).

【手続補正書】

【提出日】平成13年12月5日(2001.12.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N o t c h又はアミロイド前駆体タンパク質(A P P)プロセシングのモジュレーターを同定する方法であって、

a) プレセニンエンハンサー(p e n)遺伝子機能を破壊することによりストレスを与えた宿主細胞を用意し、前記破壊が、感作したN o t c h又はA P Pプロセシング経路を提供するのに十分であり、p e nが、ヒト(配列番号:12)、マウス(配列番号:10)、ウシ(配列番号:11)、ラット(配列番号:9)、キロシヨウジョウバエ(配列番号:8)及び線虫(配列番号:7)のP e n - 2、及びヒト(配列番号:5)、マウス(配列番号:4)、オオタバコガ(H . v i r e s c e n s)(配列番号:3)、キロシヨウジョウバエ(配列番号:2)及び線虫(配列番号:1)のP e n - 1、及びヒト(配列番号:6)のP e n - 1 Bからなる群から選択される野生型p e nのものに対して少なくとも90%の同一性で配列を含み、p e nが、野生型p e nに対して特異的な抗体に特異的に結合し、

b) N o t c h又はA P Pプロセシングの推定上のモジュレーターに前記細胞をさらし、

c) 細胞でのN o t c h又はA P Pプロセシングにおいて生じた変化を検出してN o t c h又はA P Pプロセシングのモジュレーターを同定する：

ことを含む方法。

【請求項2】

推定上のモジュレーターが化学薬品である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

推定上のモジュレーターが小分子ライブラリーからの有機化合物である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

推定上のモジュレーターがR N A iである、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

推定上のモジュレーターが抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

細胞がインサイツである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

細胞がインピトロである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

細胞が線虫又はキロシヨウジョウバエ生物体のインサイツであり、推定上のモジュレーターが遺伝子突然変異である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

細胞が線虫又はキロシヨウジョウバエ生物体のインサイツであり、推定上のモジュレーターが遺伝子突然変異であり、検出工程が生物体の表現型変化の検出を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

検出工程がN o t c hの転写レポーターを検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

検出工程がp e nの構造変化を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

検出工程がアミロイド (A) の産生を検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

検出工程が、A 特異的抗体を用いて A の産生を検出する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

破壊が (i) p e n 遺伝子のゲノム破壊、(i i) p e n 遺伝子の発現の R N A i 媒介干渉、又は (i i i) p e n 遺伝子の発現のアンチセンス R N A 干渉によって成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

破壊が p e n 遺伝子の非天然又は病原的な発現を与える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

p e n が、前記野生型ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の P e n - 2 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

p e n が、前記野生型ヒト、ラット、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の P e n - 2 からなる群から選択され；N o t c h 又は A P P プロセシングが A P P プロセシングである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

p e n が、前記野生型ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の P e n - 1 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

p e n が、前記野生型ヒト、マウス、キイロショウジョウバエ及び線虫の P e n - 1 からなる群から選択され；N o t c h 又は A P P プロセシングが A P P プロセシングである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

p e n が、前記野生型ヒト P e n - 1 又はヒト P e n - 2 である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

p e n が、前記野生型ヒト P e n - 1 B である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

A P P プロセシングのモジュレーターを同定する方法であって、

a) p e n 遺伝子機能を破壊することによりストレスを与えた宿主細胞を用意し、前記破壊が、感作した A P P プロセシング経路を提供するのに十分であり、p e n が、ヒト (配列番号：12)、マウス (配列番号：10)、ウシ (配列番号：11)、ラット (配列番号：9)、キイロショウジョウバエ (配列番号：8) 及び線虫 (配列番号：7) の P e n - 2、及びヒト (配列番号：5)、マウス (配列番号：4)、オオタバコガ (配列番号：3)、キイロショウジョウバエ (配列番号：2) 及び線虫 (配列番号：1) の P e n - 1、及びヒト (配列番号：6) の P e n - 1 B、及びヒト (配列番号：15)、キイロショウジョウバエ (配列番号：14) 及び線虫 (配列番号：13) の A p h - 2 からなる群から選択される野生型 p e n のものに対して少なくとも 90% の同一性で配列を含み、p e n が、野生型 p e n に対して特異的な抗体に特異的に結合し、

b) A P P プロセシングの推定上のモジュレーターに前記細胞をさらし、

c) 細胞での A P P プロセシングにおいて生じた変化を検出して A P P プロセシングのモジュレーターを同定する：

ことを含む方法。

【請求項 23】

p e n が、前記野生型ヒト、キイロショウジョウバエ又は線虫の A p h - 2 である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

p e n が前記野生型ヒト A p h - 2 である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

pen 遺伝子機能を破壊することによりストレスを与えた培養細胞であって、前記破壊が、感作した Notch 又は APP プロセシング経路を提供するのに十分であり、pen が、ヒト（配列番号：12）、ウシ（配列番号：11）、マウス（配列番号：10）、ラット（配列番号：9）、キイロショウジョウバエ（配列番号：8）及び線虫（配列番号：7）の Pen-2、及びヒト（配列番号：5）、マウス（配列番号：4）、オオタバコガ（配列番号：3）、キイロショウジョウバエ（配列番号：2）及び線虫（配列番号：1）の Pen-1、及びヒト（配列番号：6）の Pen-1B からなる群から選択される野生型 pen のものに対して少なくとも90%の同一性で配列を含み、pen が、野生型 pen に対して特異的な抗体に特異的に結合し、Notch 又は APP プロセシング経路が、破壊のない相当する細胞のものに関連して感受性があると決定される、培養細胞。

【請求項26】

pen 遺伝子機能を破壊することによりストレスを与えた培養細胞であって、前記破壊が、感作した APP プロセシング経路を提供するのに十分であり、pen が、ヒト（配列番号：12）、マウス（配列番号：10）、ラット（配列番号：9）、キイロショウジョウバエ（配列番号：8）及び線虫（配列番号：7）の Pen-2、及びヒト（配列番号：5）、マウス（配列番号：4）、キイロショウジョウバエ（配列番号：2）及び線虫（配列番号：1）の Pen-1、及びヒト（配列番号：6）の Pen-1B、及びヒト（配列番号：15）、キイロショウジョウバエ（配列番号：14）及び線虫（配列番号：13）の Aph-2 からなる群から選択される野生型 pen のものに対して少なくとも90%の同一性で配列を含み、pen が、野生型 pen に対して特異的な抗体に特異的に結合し、APP プロセシング経路が、破壊のない相当する細胞のものに関連して感受性があると決定される、培養細胞。

【請求項27】

Notch 又はアミロイド前駆体タンパク質（APP）プロセシングのモジュレーターを同定する方法であって、

a) プレセニリンエンハンサー（pen）遺伝子機能を破壊することによりストレスを与えた宿主細胞を用意し、前記破壊が、感作した Notch 又は APP プロセシング経路を提供するのに十分であり、pen が、ヒト（配列番号：12）、マウス（配列番号：10）、ウシ（配列番号：11）、ラット（配列番号：9）、キイロショウジョウバエ（配列番号：8）及び線虫（配列番号：7）の Pen-2、及びヒト（配列番号：5）、マウス（配列番号：4）、オオタバコガ（配列番号：3）、キイロショウジョウバエ（配列番号：2）及び線虫（配列番号：1）の Pen-1、及びヒト（配列番号：6）の Pen-1B からなる群から選択される野生型 pen のものに対して少なくとも90%の同一性で配列を含み、pen が、野生型 pen に対して特異的な抗体に特異的に結合し、

b) Notch 又は APP プロセシングの推定上のモジュレーターに前記細胞をさらし、

c) システムでのプレセニリンの量に生じた変化を検出して Notch 又は APP プロセシングのモジュレーターを同定し、量がプレセニリン N 又は C 末端断片、プレセニリンホロタンパク質の量、又はその割合として表されてもよく、プレセニリンと pen ポリペプチドの相互作用のモジュレーターを同定する：

ことを含む方法。

【請求項28】

検出可能なプレセニリンの量の変化がプレセニリン特異的抗体により検出される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

細胞が 分泌酵素レポーターを含む、請求項1、22又は27に記載の方法。

【請求項30】

細胞が、C末端 APP-Gal4 融合タンパク質及び UAS レポーター導入遺伝子を含む 分泌酵素レポーターを含み、分泌酵素による融合タンパク質の切断が Gal4 を遊離し、次にレポーターを発現する導入遺伝子の転写を活性化する、請求項1、22又は27に記載の方法。

【請求項 3 1】

p e n ポリペプチドが、ヒト、キイロショウジョウバエ又は線虫の A p h - 2 からなる群から選択される、請求項 1、2 2 又は 2 7 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 8】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Curtis, Dan

Francis, Ross

McGrath, Garth Joseph

Nicol, Sharmon Monique

Ruddy, David Andrew

Ellis, Michael Christopher

<120> Presenilin Enhancers

<130> EX00-033

<140>

<141>

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 308

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 1

Met Gly Tyr Leu Leu Thr Ile Ala Cys Tyr Ile Ala Ser Phe Ser Pro

1 5 10 15

Ser Ile Ala Leu Phe Cys Ser Phe Ile Ala His Asp Pro Val Arg Ile

20 25 30

Ile Leu Phe Phe Leu Gly Ser Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Phe

35 40 45

Ser Ser Leu Ala Trp Leu Gly Leu Ser Thr Val Leu Pro Asp Thr Phe

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

Gln Ser Val Pro Asp Glu Pro Met Thr Glu Arg Ala Gly Thr Ser Asn
 290 295 300

Thr Val Asn Ala
 305

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 2

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

Leu Phe Phe Val Thr Ser Ala Ala Gln Ala Leu Ser Ile Ile Leu Leu
 145 150 155 160
 His Thr Phe Trp Ser Val Ile Phe Phe Asn Ala Phe Asp Thr Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Ile His Ile Gly Tyr Val Val Phe Ser His Leu Phe Val Ser Leu
 180 185 190
 Ile Thr Leu Leu Asn Ala Asn Glu Leu Tyr Thr Thr Thr Leu Leu Ile
 195 200 205
 Asn Tyr Leu Val Thr Ile Leu Thr Gly Val Leu Ala Phe Arg Val Ala
 210 215 220
 Gly Gly Thr Ser Arg Ser Phe Arg Lys Phe Ile Thr Cys Gln
 225 230 235

<210> 3

<211> 126

<212> PRT

<213> *Heliothis virescens*

<400> 3

Met Thr Leu Ala Glu Phe Phe Ser Cys Ser Leu Leu Ala Phe Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Leu Val Met Phe Ala Leu Thr Val Ala Asn Asp Pro Val Arg Ile
 20 25 30
 Ile Ile Met Ile Ala Ala Ala Phe Gly Trp Leu Leu Ser Phe Leu Val
 35 40 45
 Ser Ser Val Val Trp Tyr Ala Val Val Pro Leu Arg Ser Tyr Leu Ala
 50 55 60
 Phe Gly Met Val Phe Ala Ile Ile Phe Gln Glu Val Phe Arg Tyr Gly
 65 70 75 80

Met Tyr Val Leu Leu Arg Lys Thr Glu Ala Gly Leu Lys Glu Ile Ser
 85 90 95
 Glu Asn His Asn Ile Gly Ser Asn Lys Leu Glu Met Ala Tyr Val Ser
 100 105 110
 Gly Leu Gly Phe Gly Thr Met Ser Gly Ala Phe Ala Leu Ile
 115 120 125

<210> 4

<211> 244

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

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

130 135 140
 Gly Val Val Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Phe Leu Thr Ala Ala Ile Ile Leu Leu His Thr Phe Trp Gly Val
 165 170 175
 Val Phe Phe Asp Ala Cys Glu Arg Arg Arg Tyr Trp Ala Leu Gly Leu
 180 185 190
 Val Val Gly Ser His Leu Leu Thr Ser Gly Leu Thr Phe Leu Asn Pro
 195 200 205
 Trp Tyr Glu Ala Ser Leu Leu Pro Ile Tyr Ala Val Thr Val Ser Met
 210 215 220
 Gly Leu Trp Ala Phe Ile Thr Ala Gly Val Pro Ser Glu Val Ser Ser
 225 230 235 240
 Ala Ala Phe Val

<210> 5

<211> 251

<212> PRT

<213> human

<400> 5

Met Gly Ala Ala Val Phe Phe Gly Cys Thr Phe Val Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Leu Phe Leu Ile Thr Val Ala Gly Asp Pro Leu Arg Val
 20 25 30
 Ile Ile Leu Val Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Leu
 35 40 45
 Ala Ser Val Val Trp Phe Ile Leu Val His Val Thr Asp Arg Ser Asp
 50 55 60
 Ala Arg Leu Gln Tyr Gly Leu Leu Ile Phe Gly Ala Ala Val Ser Val

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 | | | | | | | | | |
| Leu | Leu | Gln | Glu | Val | Phe | Arg | Phe | Ala | Tyr | Tyr | Lys | Leu | Leu | Lys | Lys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Ala | Asp | Glu | Gly | Leu | Ala | Ser | Leu | Ser | Glu | Asp | Gly | Arg | Ser | Pro | Ile |
| | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | | |
| Ser | Ile | Arg | Gln | Met | Ala | Tyr | Val | Ser | Gly | Leu | Ser | Phe | Gly | Ile | Ile |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| Ser | Gly | Val | Phe | Ser | Val | Ile | Asn | Ile | Leu | Ala | Asp | Ala | Leu | Gly | Pro |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | | 140 | | | |
| Gly | Val | Val | Gly | Ile | His | Gly | Asp | Ser | Pro | Tyr | Tyr | Phe | Leu | Thr | Ser |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Ala | Phe | Leu | Thr | Ala | Ala | Ile | Ile | Leu | Leu | His | Thr | Phe | Trp | Gly | Val |
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 |
| Val | Phe | Phe | Asp | Ala | Cys | Glu | Arg | Arg | Arg | Tyr | Trp | Ala | Leu | Gly | Leu |
| | | | | 180 | | | | | | 185 | | | | 190 | |
| Val | Val | Gly | Ser | His | Leu | Leu | Thr | Ser | Gly | Leu | Thr | Phe | Leu | Asn | Pro |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | | | 205 | |
| Trp | Tyr | Glu | Ala | Ser | Leu | Leu | Pro | Ile | Tyr | Ala | Val | Thr | Val | Ser | Met |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | | | 220 | |
| Gly | Leu | Trp | Ala | Phe | Ile | Thr | Ala | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Ser | Ile | Gln |
| 225 | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | | 240 |
| Arg | Ser | Ser | Cys | Val | Arg | Thr | Asp | Tyr | Leu | Asp | | | | | |
| | | | | 245 | | | | | | | 250 | | | | |

<210> 6

<211> 257

<212> PRT

<213> human

<400> 6

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

225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 7

<211> 101

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 7

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

<210> 8

<211> 101

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 8

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

<210> 9

<211> 101

<212> PRT

<213> rat

<400> 9

Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
 20 25 30
 Asn Ile Phe Trp Phe Phe Lys Glu Ala Phe Phe Ala Pro Ala Tyr Ser
 35 40 45
 Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
 50 55 60

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 11

Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
 20 25 30
 Asn Ile Phe Trp Phe Phe Arg Glu Ala Phe Ile Val Pro Ala Tyr Thr
 35 40 45
 Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
 50 55 60
 Phe Leu Trp Val Ile Val Leu
 65 70

<210> 12

<211> 101

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Met Asn Leu Glu Arg Val Ser Asn Glu Glu Lys Leu Asn Leu Cys Arg
 1 5 10 15
 Lys Tyr Tyr Leu Gly Gly Phe Ala Phe Leu Pro Phe Leu Trp Leu Val
 20 25 30
 Asn Ile Phe Trp Phe Phe Arg Glu Ala Phe Leu Val Pro Ala Tyr Thr
 35 40 45
 Glu Gln Ser Gln Ile Lys Gly Tyr Val Trp Arg Ser Ala Val Gly Phe
 50 55 60
 Leu Phe Trp Val Ile Val Leu Thr Ser Trp Ile Thr Ile Phe Gln Ile
 65 70 75 80

Tyr Arg Pro Arg Trp Gly Ala Leu Gly Asp Tyr Leu Ser Phe Thr Ile
 85 90 95
 Pro Leu Gly Thr Pro
 100

<210> 13

<211> 721

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 13

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

Glu Val Gln Gln Ile Gly Val Ala Lys Gly Arg Lys Tyr Tyr Val His
 385 390 395 400
 Val Asp Gly Glu Arg Tyr Gln Gln Asn Lys Thr Gln Thr Asp Arg Val
 405 410 415
 Ile Asp Arg Ile Glu Arg Gly Leu Arg Ser His Ala Phe Asp Leu Glu
 420 425 430
 Lys Pro Ser Gly Ser Gly Asp Arg Val Pro Pro Ala Ser Trp His Ser
 435 440 445
 Phe Ala Lys Ala Asp Ala His Val Gln Ser Val Leu Leu Ala Pro Tyr
 450 455 460
 Gly Lys Glu Tyr Glu Tyr Gln Arg Val Asn Ser Ile Leu Asp Lys Asn
 465 470 475 480
 Glu Trp Thr Glu Asp Glu Arg Glu Lys Ala Ile Gln Glu Ile Glu Ala
 485 490 495
 Val Ser Thr Ala Ile Leu Ala Ala Ala Ala Asp Tyr Val Gly Val Glu
 500 505 510
 Thr Asp Glu Val Val Ala Lys Val Asp Lys Lys Leu Ile Thr Thr Ile
 515 520 525
 Phe Asp Cys Leu Ile Thr Ser Asn Phe Trp Phe Asp Cys Asp Phe Met
 530 535 540
 Gln Lys Leu Asp Gly Gly Arg Tyr His Lys Leu Phe Asn Ser Tyr Gly
 545 550 555 560
 Phe Asn Gln Lys Ser Thr Tyr Ile Ser Met Glu Ser His Thr Ala Phe
 565 570 575
 Pro Thr Val Leu His Trp Leu Thr Ile Phe Ala Leu Gly Ser Asp Lys
 580 585 590
 Glu Thr Leu Asn Val Lys Ser Glu Lys Ser Cys Ser His Leu Gly Gln
 595 600 605
 Phe Gln Ala Met Tyr Thr Tyr Thr Trp Gln Pro Asn Pro Tyr Thr Gly

610 615 620
 Asn Phe Ser Cys Leu Lys Ser Ala Ile Val Lys Lys Val Met Val Ser
 625 630 635 640
 Pro Ala Val Asp Ser Gln Thr Pro Glu Glu Glu Met Asn Thr Arg Tyr
 645 650 655
 Ser Thr Trp Met Glu Ser Val Tyr Ile Ile Glu Ser Val Asn Leu Tyr
 660 665 670
 Leu Met Glu Asp Ala Ser Phe Glu Tyr Thr Met Ile Leu Ile Ala Val
 675 680 685
 Ile Ser Ala Leu Leu Ser Ile Phe Ala Val Gly Arg Cys Ser Glu Thr
 690 695 700
 Thr Phe Ile Val Asp Glu Gly Glu Pro Ala Ala Glu Gly Gly Glu Pro
 705 710 715 720
 Leu

<210> 14

<211> 716

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 14

His Glu Pro Lys Arg Ser His Ala Thr Leu Gln Phe Leu Asp Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Trp Glu Ser Ser Met Glu Met Arg Leu Asn Ala Ala Ser Ile Trp
 20 25 30
 Leu Leu Ile Leu Ser Tyr Gly Ala Thr Ile Ala Gln Gly Glu Arg Thr
 35 40 45
 Arg Asp Lys Met Tyr Glu Pro Ile Gly Gly Ala Ser Cys Phe Arg Arg
 50 55 60
 Leu Asn Gly Thr His Gln Thr Gly Cys Ser Ser Thr Tyr Ser Gly Ser

| | | | | | | |
|---|--|-----|--|-----|--|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 |
| Val Gly Val Leu His Leu Ile Asn Val Glu Ala Asp Leu Glu Phe Leu | | | | | | |
| | | 85 | | 90 | | 95 |
| Leu Ser Ser Pro Pro Ser Pro Pro Tyr Ala Pro Met Ile Pro Pro His | | | | | | |
| | | 100 | | 105 | | 110 |
| Leu Phe Thr Arg Asn Asn Leu Met Arg Leu Lys Glu Ala Gly Pro Lys | | | | | | |
| | | 115 | | 120 | | 125 |
| Asn Ile Ser Val Val Leu Leu Ile Asn Arg Thr Asn Gln Met Lys Gln | | | | | | |
| | | 130 | | 135 | | 140 |
| Phe Ser His Glu Leu Asn Cys Pro Asn Gln Tyr Ser Gly Leu Asn Ser | | | | | | |
| 145 | | 150 | | 155 | | 160 |
| Thr Ser Glu Thr Cys Asp Ala Ser Asn Pro Ala Lys Asn Trp Asn Pro | | | | | | |
| | | 165 | | 170 | | 175 |
| Trp Gly Thr Gly Leu Leu His Glu Asp Phe Pro Phe Pro Ile Tyr Tyr | | | | | | |
| | | 180 | | 185 | | 190 |
| Ile Ala Asp Leu Asp Gln Val Thr Lys Leu Glu Lys Cys Phe Gln Asp | | | | | | |
| | | 195 | | 200 | | 205 |
| Phe Asn Asn His Asn Tyr Glu Thr His Ala Leu Arg Ser Leu Cys Ala | | | | | | |
| | | 210 | | 215 | | 220 |
| Val Glu Val Lys Ser Phe Met Ser Ala Ala Val Asn Thr Glu Val Cys | | | | | | |
| 225 | | 230 | | 235 | | 240 |
| Met Arg Arg Thr Asn Phe Ile Asn Asn Leu Gly Gly Ser Lys Tyr Cys | | | | | | |
| | | 245 | | 250 | | 255 |
| Asp Pro Leu Glu Gly Arg Asn Val Tyr Ala Thr Leu Tyr Pro Glu Ser | | | | | | |
| | | 260 | | 265 | | 270 |
| Gln Gln Ser Lys Thr Thr Trp Arg Gln Ser Ile Arg Met Lys Ser Ser | | | | | | |
| | | 275 | | 280 | | 285 |
| Ile Ser Asn Leu Ser Pro Gly His His His His Val Arg Trp Arg Arg | | | | | | |
| | | 290 | | 295 | | 300 |

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

530 535 540
 Cys Phe Leu Gln Ser Ala Asp Cys Pro Leu Phe Lys Ala Ala Ser Tyr
 545 550 555 560
 Pro Gly Ser Gln Leu Thr Asn Leu Pro Pro Met Arg Tyr Ile Ser Val
 565 570 575
 Leu Gly Gly Ser Gln Glu Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Arg Leu Leu Gly
 580 585 590
 Tyr Leu Leu Ser Gln Leu Gln Pro Asp Ile His Arg Asp Asn Cys Thr
 595 600 605
 Asp Leu Pro Leu His Tyr Phe Ala Gly Phe Asn Asn Ile Gly Glu Cys
 610 615 620
 Arg Leu Thr Thr Gln Asn Tyr Ser His Ala Leu Ser Pro Ala Phe Leu
 625 630 635 640
 Ile Asp Gly Tyr Asp Trp Ser Ser Gly Met Tyr Ser Thr Trp Ala Glu
 645 650 655
 Ser Thr Trp Ser Gln Phe Ser Ala Arg Ile Phe Leu Arg Pro Ser Asn
 660 665 670
 Val His Gln Val Thr Thr Leu Ser Val Gly Ile Val Val Leu Ile Ile
 675 680 685
 Ser Phe Cys Leu Val Tyr Ile Ile Ser Ser Arg Ser Glu Val Leu Phe
 690 695 700
 Glu Asp Leu Pro Ala Ser Asn Ala Ala Leu Phe Gly
 705 710 715

<210> 15

<211> 708

<212> PRT

<213> human

<400> 15

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

225 230 235 240
 Ile Asn Pro Glu Ile Val Cys Asp Pro Leu Ser Asp Tyr Asn Val Trp
 245 250 255
 Ser Met Leu Lys Pro Ile Asn Thr Thr Gly Thr Leu Lys Pro Asp Asp
 260 265 270
 Arg Val Val Val Ala Ala Thr Arg Leu Asp Ser Arg Ser Phe Phe Trp
 275 280 285
 Asn Val Ala Pro Gly Ala Glu Ser Ala Val Ala Ser Phe Val Thr Gln
 290 295 300
 Leu Ala Ala Ala Glu Ala Leu Gln Lys Ala Pro Asp Val Thr Thr Leu
 305 310 315 320

 Pro Arg Asn Val Met Phe Val Phe Phe Gln Gly Glu Thr Phe Asp Tyr
 325 330 335
 Ile Gly Ser Ser Arg Met Val Tyr Asp Met Glu Lys Gly Lys Phe Pro
 340 345 350
 Val Gln Leu Glu Asn Val Asp Ser Phe Val Glu Leu Gly Gln Val Ala
 355 360 365
 Leu Arg Thr Ser Leu Glu Leu Trp Met His Thr Asp Pro Val Ser Gln
 370 375 380
 Lys Asn Glu Ser Val Arg Asn Gln Val Glu Asp Leu Leu Ala Thr Leu
 385 390 395 400
 Glu Lys Ser Gly Ala Gly Val Pro Ala Val Ile Leu Arg Arg Pro Asn
 405 410 415
 Gln Ser Gln Pro Leu Pro Pro Ser Ser Leu Gln Arg Phe Leu Arg Ala
 420 425 430
 Arg Asn Ile Ser Gly Val Val Leu Ala Asp His Ser Gly Ala Phe His
 435 440 445
 Asn Lys Tyr Tyr Gln Ser Ile Tyr Asp Thr Ala Glu Asn Ile Asn Val

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 450 | | 455 | | 460 |
| Ser Tyr Pro Glu Trp Leu Ser Pro Glu Glu Asp Leu Asn Phe Val Thr | | | | |
| 465 | | 470 | | 480 |
| Asp Thr Ala Lys Ala Leu Ala Asp Val Ala Thr Val Leu Gly Arg Ala | | | | |
| | 485 | | 490 | 495 |
| Leu Tyr Glu Leu Ala Gly Gly Thr Asn Phe Ser Asp Thr Val Gln Ala | | | | |
| | 500 | | 505 | 510 |
| Asp Pro Gln Thr Val Thr Arg Leu Leu Tyr Gly Phe Leu Ile Lys Ala | | | | |
| | 515 | | 520 | 525 |
| Asn Asn Ser Trp Phe Gln Ser Ile Leu Arg Gln Asp Leu Arg Ser Tyr | | | | |
| | 530 | | 535 | 540 |
| Leu Gly Asp Gly Pro Leu Gln His Tyr Ile Ala Val Ser Ser Pro Thr | | | | |
| 545 | | 550 | | 560 |
| Asn Thr Thr Tyr Val Val Gln Tyr Ala Leu Ala Asn Leu Thr Gly Thr | | | | |
| | 565 | | 570 | 575 |
| Val Val Asn Leu Thr Arg Glu Gln Cys Gln Asp Pro Ser Lys Val Pro | | | | |
| | 580 | | 585 | 590 |
| Ser Glu Asn Lys Asp Leu Tyr Glu Tyr Ser Trp Val Gln Gly Pro Leu | | | | |
| | 595 | | 600 | 605 |
| His Ser Asn Glu Thr Asp Arg Leu Pro Arg Cys Val Arg Ser Thr Ala | | | | |
| | 610 | | 615 | 620 |
| Arg Leu Ala Arg Ala Leu Ser Pro Ala Phe Glu Leu Ser Gln Trp Ser | | | | |
| 625 | | 630 | | 640 |
| Ser Thr Glu Tyr Ser Thr Trp Thr Glu Ser Arg Trp Lys Asp Ile Arg | | | | |
| | 645 | | 650 | 655 |
| Ala Arg Ile Phe Leu Ile Ala Ser Lys Glu Leu Glu Leu Ile Thr Leu | | | | |
| | 660 | | 665 | 670 |
| Thr Val Gly Phe Gly Ile Leu Ile Phe Ser Leu Ile Val Thr Tyr Cys | | | | |
| | 675 | | 680 | 685 |

Gly Val Phe Thr Phe Val Asn Thr Leu Ser Asp Ser Leu Val Pro Gly
 130 135 140
 Thr Val Gly Ile His Gly Asp Trp Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Ser Ala
 145 150 155 160
 Phe Tyr Thr Leu Val Ile Ile Leu Leu His Val Ala Trp Gly Ile Val
 165 170 175
 Phe Phe Asp Gly Cys Asp Lys Lys Lys Trp Gly Ile Leu Leu Ile Glu
 180 185 190
 Leu Leu Thr His Leu Leu Val Ser Ala Phe Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Gly Leu Ala Ser Ala Phe Ile Ile Leu Val His Met Gly
 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Leu Ala Ala Ile Gly Ser Cys Arg Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Lys Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Leu Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 17

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 17

Met Thr Asp Ala Val Phe Phe Gly Cys Ala Phe Ile Glu Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Leu Tyr Val Gly Thr Ile Ala Thr Glu Pro Leu Arg Ile

Arg

<210> 18

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 18

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

145 150 155 160
 Phe Met Thr Asp Val Ile Ile Leu Leu His Val Phe Trp Glu Ile Val
 165 170 175
 Phe Phe Asp Gly Cys Glu Lys Phe Lys Trp Gly Ile Leu Leu Ile Val
 180 185 190
 Leu Gly Thr His Leu Leu Val Ser Ala Gln Thr His Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile Ile Leu Val Leu Met Lys
 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Leu Ala Ala Gly Gly Leu Cys Arg Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Met Gln Asp Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Asn Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 19

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 19

Met Thr Ala Ala Ala Phe Phe Gly Cys Ala Phe Ile Ala Phe Asp Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Leu Tyr Val Phe Thr Glu Ala Thr Glu Pro Leu Arg Ile
 20 25 30
 Ile Phe Phe Ile Ala Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Gly Leu Leu Ile
 35 40 45

Ser Ser Leu Val Trp Phe His Ala Arg Val Ile Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60
 Ile Pro Thr Gln Lys Tyr Leu Leu Ile Phe Lys Ala Phe Val Ser Val
 65 70 75 80
 Tyr Ile Gln Glu Leu Phe Arg Phe Ala Tyr Tyr Lys Leu Leu Met Lys
 85 90 95
 Ala Ser Glu Gly Leu Lys Ser Ile Gln Pro Gly Glu Thr Ala Pro Ser
 100 105 110
 Met Arg Arg Leu Ala Tyr Val Ser Gly Leu Gly Phe Ser Ile Met Ser
 115 120 125
 Gly Val Phe Ser Phe Val Thr Thr Leu Ser Asp Ser Leu Gly Pro Gly
 130 135 140
 Val Val Gly Ile His Gly Asp Ser Pro Gln Trp Phe Leu Tyr Ser Ala
 145 150 155 160
 Phe Met Thr Leu Tyr Ile Ile Leu Leu His Val Phe Trp Gly Ala Val
 165 170 175
 Phe Phe Asp Gly Cys Glu Lys Lys Asp Trp Gly Ile Leu Leu Ile Val
 180 185 190
 Leu Leu Glu His Leu Leu Val Ser Ala Gln Thr Phe Phe Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Gly Ala Phe Ile Ile Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 His Trp Ala Phe Leu Ala Ala Gly Gly Ser Ile Arg Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Lys Asp Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Leu Ser
 245 250 255
 Arg

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 20

```

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

```

Phe Phe Asp Gly Cys Glu Lys Lys Lys Ala Gly Ile Leu Leu Ile Val
 180 185 190
 Leu Leu Thr Asp Leu Leu Val Ser Ala Gln Thr Phe Ile Glu Ser Tyr
 195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Ser Phe Phe Ile Ile Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 Thr Gly Ala Phe Leu Ala Ala Gly Gly Ser Cys His Ser Leu Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Ile Lys Asn Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Lys
 245 250 255

Arg

<210> 21

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 21

Met Thr Ala Ala Val Phe Ala Gly Cys Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Asp Leu Ala Leu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Glu Glu Pro Leu Arg Ile
 20 25 30
 Ile Phe Leu Ile Phe Gly Ala Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Gly Ile
 35 40 45
 Ser Ser Leu Val Trp Phe Met Ala His Val Ile Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60
 Gly Pro Ile Gln Lys Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Ala Lys Val Ser Val

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 22

```

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

```

195 200 205
 Tyr Gly Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Lys Ile Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 Thr Trp Ala Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Met Lys Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Gln Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 23

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 23

Met Thr Ala Ala Val Phe Phe Gly Ala Ala Phe Ile Ala Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Asp Leu Tyr Val Phe Thr Ile Ala Thr Glu Glu Leu Arg Ile
 20 25 30
 Ile Phe Leu Ile Ala Gly Phe Phe Phe Trp Leu Val Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Gly Ser Leu Val Trp Phe Met Ala Arg Val His Ile Asp Asn Lys Asp
 50 55 60
 Gly Pro Thr Gln Ile Tyr Leu Leu Ile Phe Gly Ala Phe Val Lys Val
 65 70 75 80
 Tyr Ile Gln Glu Met Phe Arg Phe Leu Tyr Tyr Lys Leu Leu Lys Lys
 85 90 95

Ala Ser Met Gly Leu Lys Ser Ile Asn Pro Gly Glu Asn Ala Pro Ser
 100 105 110
 Met Arg Leu Leu Ala Tyr Gln Ser Gly Leu Gly Phe Gly Ile Met Ser
 115 120 125
 Arg Val Phe Ser Phe Val Asn Thr Leu Ser Ser Ser Leu Gly Pro Gly
 130 135 140
 Thr Val Gly Ile Thr Gly Asp Ser Pro Gln Phe Phe Leu Tyr Val Ala
 145 150 155 160
 Phe Met Thr Leu Val Ile Ile Leu Trp His Val Phe Trp Gly Ile Val
 165 170 175
 Phe Phe Tyr Gly Cys Glu Lys Lys Lys Trp Gly Ile Ala Leu Ile Val
 180 185 190
 Leu Leu Thr His Leu Leu Asp Ser Ala Gln Thr Phe Ile Ser Ser Tyr
 195 200 205
 Glu Gly Ile Asn Leu Ala Ser Ala Phe Ile Phe Leu Val Leu Met Gly
 210 215 220
 Thr Trp Ala Phe Gly Ala Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Leu His Leu
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Ile Leu Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 24

<211> 257

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 24

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

Thr Trp Ala Phe Leu Leu Ala Gly Gly Ser Cys Arg Ser Leu Lys Met
 225 230 235 240
 Cys Leu Leu Cys Gln Asp Lys Asn Phe Asn Leu Tyr Asn Gln Arg Ser
 245 250 255

Arg

<210> 25

<211> 925

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 Sequence

<400> 25

Gly Ala Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Gly Cys Gly Cys Cys Thr
 20 25 30
 Thr Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Cys Cys
 35 40 45
 Thr Gly Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala
 50 55 60
 Gly Thr Cys Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys Ala
 65 70 75 80
 Cys Cys Gly Ala Gly Cys Cys Gly Thr Thr Gly Cys Gly Thr Ala Thr
 85 90 95
 Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Gly Cys Cys
 100 105 110
 Gly Gly Ala Gly Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 115 | 120 | 125 | |
| Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Ala Cys Thr Gly Ala Thr | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| Thr Thr Cys Gly Thr Cys Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr Thr Gly Gly | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Thr Thr Cys Ala Thr Gly Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Thr Cys Ala | | | |
| 165 | 170 | 175 | |
| Thr Thr Ala Thr Thr Gly Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Gly Ala | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Ala Ala Ala | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Thr Ala Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gly Ala Gly Cys Gly Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys Thr Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Gly | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Thr Thr Cys Cys Gly Ala Thr Thr Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Thr | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Ala Gly Cys Cys Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Thr Thr Gly | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Ala Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Gly | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Gly Thr Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Thr Ala Thr Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Cys Cys | | | |
| 340 | 345 | 350 | |

Thr Ala Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly
 355 360 365
 Gly Cys Thr Thr Thr Gly Gly Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Ala Gly
 370 375 380
 Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Thr Thr Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr
 385 390 395 400
 Gly Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Thr Cys Thr Gly
 405 410 415
 Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly
 420 425 430
 Cys Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Ala Thr
 435 440 445
 Gly Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala Ala Thr
 450 455 460
 Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Thr Cys Ala Gly Cys
 465 470 475 480
 Thr Thr Thr Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys
 485 490 495
 Ala Thr Thr Ala Thr Cys Thr Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala Thr Gly
 500 505 510
 Thr Ala Thr Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Thr
 515 520 525
 Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr
 530 535 540
 Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly
 545 550 555 560
 Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Thr
 565 570 575
 Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Thr Gly

| | | | | | |
|---|-----|--|-----|--|-----|
| | 580 | | 585 | | 590 |
| Cys Thr Gly Gly Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala | | | | | |
| | 595 | | 600 | | 605 |
| Cys Cys Thr Thr Cys Ala Thr Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Thr Ala | | | | | |
| | 610 | | 615 | | 620 |
| Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Ala Ala Ala Cys Cys Thr Gly | | | | | |
| | 625 | | 630 | | 635 |
| Gly Cys Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala | | | | | |
| | | | 645 | | 650 |
| | | | | | 655 |
| Thr Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly | | | | | |
| | 660 | | 665 | | 670 |
| Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Cys Thr Thr Ala | | | | | |
| | 675 | | 680 | | 685 |
| Gly Cys Thr Gly Cys Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Thr | | | | | |
| | 690 | | 695 | | 700 |
| Gly Cys Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr | | | | | |
| | 705 | | 710 | | 715 |
| Cys Thr Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala | | | | | |
| | | | 725 | | 730 |
| | | | | | 735 |
| Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Cys | | | | | |
| | 740 | | 745 | | 750 |
| Thr Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Thr Cys | | | | | |
| | 755 | | 760 | | 765 |
| Cys Ala Gly Ala Thr Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala | | | | | |
| | 770 | | 775 | | 780 |
| Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala | | | | | |
| | 785 | | 790 | | 795 |
| | | | | | 800 |
| Cys Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Thr Thr | | | | | |
| | | | 805 | | 810 |
| | | | | | 815 |

Thr Ala Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Cys Ala Cys Ala Ala Cys Thr
 820 825 830
 Gly Thr Gly Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala
 835 840 845
 Ala Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Gly Thr Gly
 850 855 860
 Gly Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr
 865 870 875 880
 Ala Ala Ala Ala Cys Thr Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Thr Ala Thr
 885 890 895
 Gly Cys Gly Thr Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 900 905 910
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 915 920 925

<210> 26

<211> 925

<212> DNA

<213> human

<400> 26

gatgactgcg gccgigtct tcggctgccc cttcattgcc ttccggcctg cgctcgcct 60
 ttatgtcttc accatcgcca ccgagccgtt gcgtatcacc ttccatcgcg ccggagcttt 120
 cttctgggtg gtgtctctac tgatttcgtc ccttgtttgg ttcatggcaa gagicattat 180
 tgacaacaaa gatggaccaa cacagaaata tctgctgacc ttgggagcgt ttgtctctgt 240
 ctatatccaa gaaatgttc gatttgcata ttataaactc ttaaaaaaag ccagtgaagg 300
 ttgaagagt ataaaccag gtgagacagc accctctatg cgactgctgg cctaigtctc 360
 tggcttgggc ttggaatca tgagiggagt atttccittt gtgaataccc tctctgactc 420
 cttggggcca ggcacagtgg gcattcatgg agattctcct caattcttcc tttattcagc 480
 tttcatgacg ctggtcatta tcttctgcca tgtattctgg ggcattgtat tttttagatg 540

ctgtgagaag aaaaagtggg gcatcctcct tatcgttctc ctgaccacc tgctgggtgc 600
 agcccagacc ttcataagt ttattatgg aataaacctg gcgtcagcat ttataatcct 660
 ggtgctcatg ggcacctggg caticttagc tgcgggaggc agctgccgaa gcctgaaact 720
 ctgacctctc tgccaagaca agaactttct tctttacaac cagcgtcca gataacctca 780
 ggaaccagc acttcccaaa ccgagacta catctttaga ggaagcaca ctgtgccttt 840
 ttctgaaaat cctttttct ggtggaattg agaaagaaat aaaactatgc agatatgcgt 900
 tccaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 925

<210> 27

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 27

gatgacagcg gccgttttct tcggctgcgc cttgattgcc ttagggcctg ctctcgcct 60
 ctaigtcttg accatcgcaa ccgagccttt gcgtatcacc ttcctgatcg ccggagcttt 120
 cttttggttg gtctctctac tgatttcgtc acttgtttgt ttcattggcca gactcatgat 180
 tgacaaaaaa gatggtccaa cacacaaata tctgctgacc ttaggagcgt ttgtctctgt 240
 ctatattccag gaaatgttac gatttgccta ttataacctc ttaaagaaag ccagagaagg 300
 ttttaagagt atcaaccag gggagacagc accctctatt cgactgctcg cctatgtgtc 360
 tggcttaggc tttggtatca tgagcggagt attgtccttt gtaaatacc tgtctgactc 420
 cttggggccg ggcacagtag gcattcaggg agattccct caattgttcc tttaatcagc 480
 ttttatgacg ctctgcatta tgttctgca agtattctgt ggcattgtct tttttgaggg 540
 ctgtgaaaag aaaaattggg gcatcctcct tatggttctc ctaaccacc ttctgggtgc 600
 cgcccagacg ttcataagat ttattatgg aataaacctg gcgtcggcat ttataatcct 660
 ggttctcatg ggcacctggg cgttcttagc agcgggagg agctgccgca gcctgaagct 720
 ctgcttactc tgccatgaca agaactttct tctgtacaac caacgtcca gttaacctca 780

cggaaccagg acttccaaa ccgagatta catcttcaga ggaaggacaa cgtaccitt 840
ttctgaaaat cctttttct ggtggaattg agaaagaaat aaaactatcc agatatgggt 900
tccaaaaaaa aaaataaaa aaaac 925

<210> 28

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 28

gatgactgcg gccgtcttct tgggtgccc ctttaattgcc tttgggacctg ccttcgccct 60
gtaatgctta accatcgcta ccgagccctt gcgtatgata ttctaatacg ccggtgcttt 120
cttctgggtg gtgtctctac taatttcgtc tcttgtttgc ttcattggca gactcataat 180
tgacaataaa gatggcccaa cacagaaata tctactgata tttggagcgt tctctctgt 240
gtatatccaa gaaatgtttc gatttgccca ttataagctc ttaaaaaaag ccagtgaagg 300
ttcaagagt atgaaccag gagagacagc tccctctatc cgactgcctg cctatgtatc 360
tggctttggc tttggcatca tgaggggagt attatccttt gtttaatacc tctctgactc 420
gttggggcca ggcacagtgg gcattcacgg agattcgccct caattattcc tttattcagc 480
tttcatgacg ctggicatta tatgtctgca tgtattctgc ggcattgigt ttttgaagg 540
ctgtgataag aaaaactggg gcatgctctt tatagttctc cttaccacc tctgggtgtc 600
ggcccagaca ttcataagtt cttattacgg aataaagctg gcgtcagcat ttattatcct 660
ggctctcatg gggacctggg cattcttagc tgcgggagcc agctgccgga gcctgaaact 720
ctgcttctc tgcacgaca agaagtttct tctatacaac catcgtctca gctaacctca 780
gggaaccaga acttccata ccgagacta catcttgaga ggaagaacaa ctgttccttt 840
ttccgaaaat ccgttttct gatggaattg tgaagaaac aaaactatgc agatatgagt 900
tccaaataaa aaaacaaaa aaaag 925

<210> 29

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 29

```
gatgaccgcg gccgtgttct tcggatgccc ctttattgcc ttcgggcctg cgctcgcctt 60
ataatgtctt accatcgcca ccgagccgtt gcgtataatc ttccttatcg ccggcgcctt 120
cttgtggttg gtaiccttac ttatttcgtc ctttgtttgg ttcattggcaa gagtcattat 180
tgacaacaaa gatgggcca cacaataata tcttctgac ttcggagcgt tggctctcgt 240
atatatccat gaaatgttcc gatttgcgta ttataaactc ttaaataaag ccagcgaagg 300
tttgaagagt ataaaccagc gtgagacagc cccctctatg cgactgctag cctatgtttc 360
tggcttcggc ttgggatca tgagaggagt attttccttt gtcaataccc tgtctgactc 420
attggggcct ggcacagtcg gcattcaggg agattcacct caattttcc tttactcagc 480
tttgatgacg ctagtcatca ttttctgca cgtattctgg ggcattgtat tttttgatgg 540
cttgacaag aaaaagtggg gcatactcct tattgttctc ctcaccacc tgcctggctc 600
agcccagact ttcataagct cttattaggg aataaaactg gcgtctgcat ttatcactct 660
ggctctcatg ggaacctggg ctttcttagc cgcgggaggg agctgccgaa gcctgaatct 720
ctgctctctc tgccaggaca agaaattct tctttacaac caccgtcca ggtaacctca 780
aggaaccagt acttcccaca ccgagagta catcttaaga ggaagtacaa ctgtcccttt 840
ttcggaaaaa ccatTTTTCT gttggaattg cgaagaaag aaaactatac agatattgtt 900
tccaaacaaa aaaaagaaaa aaaaaa                                     925
```

<210> 30

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 30

```
gatgacggcg gccgtattct tcggttgcgc cttcattgcc ttggggcctg cactcgcctt 60
ttaigtcttc accatcgca cggagccatt gcgtattatc ttccatcgc cggggcctt 120
citatggitg gtttctctac tcatttcgic gcttggttga ttcattggcta gactcatcat 180
tgacaagaaa gatggaccaa cacataaata tctcctgac ttgggagcgt tagtctctgt 240
ttatatccac gaaatgttgc gatttgcata ttataatctc ttaacaaag ccaggggaagg 300
tttaaagagt attaacccag gcgagacagc gccctctata cgactgcttg cctatgtctc 360
tggcttgggc ttggaatca tgagtggagt attctccttt gigaataccc tatctgactc 420
tttggggccc ggcacagtgg gcattcaagg agattctcct caattcttcc tttagtcagc 480
tttaatgacg cttgtcatta tcttgcctga ggtattctga ggcattgttt tttttgacgg 540
ctgtgagaag aaaaaatggg gcattctcct tatcgttctc ctgaccacc tactgggtgc 600
tgcccagacc ttcataaggc cttattaagg aataaatctg gcgtccgcat ttaigtatcct 660
ggtactcaig ggtacctggg cttcttagc ggcgggagga agctgccgta gcctgaacct 720
ctgcctgctc tgccaagaca agaatttct tctctacaac cagcgtcca gataacctca 780
tggaaccagc acttcccaga ccgcagaata catctttaga ggaagcacia ctgtgccttt 840
ttcagaaaaa cttttttct gctggaattg ggaaagaaaa aaaactatc agatatgcgt 900
tccaaagaaa aaaaaaaaaa aaaaat 925
```

<210> 31

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 31

gatgactgca gccgigtitt tcggctgccc cttcatggcc ttcggacctg cgcttgcctt 60
ttacgtcttc acgatcgcca cagagccgtt tcgtatcatic ttectcatgg ccggagcatt 120
cttctgtttg gtgicccctac tgaigtctgc cctagtittgg tttatggcaa gcgicattat 180
ggacaacaaa gatggacctc cacagaacta tctgctgatic tttggagcgt ttgtttctgt 240
ctacatccaa gagatgttcc gatttgcata ttataaacct ttaaaaaagg ccagtgaagg 300
tttgaatagt ataaaccag gtgagacagc accatctatg cgtctgctgg cctatgtttc 360
ggcttggga tttggaatta tgagtgccgt attttctgtt gtgaaaacc tctctgactc 420
cttcgggcca gggacagtgg gaattcatgg tgattctccc caattcttgc tttattcagc 480
tttcattacg ctggicatta tcttctgca tgtattctgg ggtattgtat tctttgatgg 540
gtgtgagaaa aaaaagtgtg gcacctctct tatcgtctc ctgacacacc tgcctgtgtc 600
agccagacc ttgataagt catattatgg tataaacctc gcctcagcgt ttataaact 660
gggtcttatg ggcacctggg catgtttagc tgcaggaggc agttgccgaa gcctgaaact 720
gtgcttctca tgccaagata agaacttctt tctttagaac cagcgatcca gatattctca 780
ggcaccagc acgtcccaaa cagcagacta tatctttagc ggaagcacga ctgtgccatt 840
ttctgataat ccttcttctt ggtggaattg agaaagaat aatactatgc acatatgcgt 900
gccaaaaaaa aaaaaaata aaaaa 925

<210> 32

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 32

gatgactgct gccgigtitt tcggctgggc cttcatagcc ttcggtctctg cgctcgcctt 60
ttaggcttc acaatcgcca ctgagccgtt ccgtatcatg ttectcatag ccggagcttt 120
cttctgtttg gtgicgctac tgaatctgct ccttgtttgg tttatggcaa gggicattat 180
agacaacaa gatggaccca cacagaagta tctgctaatic tttggtcgt ttgtctctgt 240

ctatgccaa gaaatgtcc gtttgcata ctataaactg ttaaaaaag ccagtgatgg 300
 tttgaacagt ataaagccag gtgaacagc accttctatg cgctgctgg cgtaatgttc 360
 aggcttgggt ttggaatca tgagtggggt atttccattt gtgaataccc tatccgactc 420
 cttggggcca ggaacagtgg gtattcatgg cgattctccg caattcttac tttattctgc 480
 tttcatcagc cttgtgatta tcttactgca tgtttctcgg ggcatgtat tgtttgatgg 540
 atgtgagaat aaaaagtgcg gcatcctgct tatcgtactc ctgactcacc tgcctgtgic 600
 agcgagacc ttaataagtt cttattatgg cataaacctg gcgtcagcat ttataattct 660
 ggtgctcatg ggcacgtggg cattattagc tgcctggaggc agctgccgaa ggctgaaact 720
 atgctgtctt tgccaagaca agaacttctt tctttaaac cagcgttcca gataccctca 780
 ggggaccagc acatcccaaa ctgcagacta catctttagg ggaagcaca ctgtgccttt 840
 tctgacaat ccctgttctt ggtgaaattg agatagaaat aacactatgc agatatgctg 900
 accaaaaat aaaaaaaca aaaaa 925

<210> 33

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 33

gatgactgcc gccgtgttgt tcggctgagc cttcattgcc ttcggcccig cgctggccct 60
 ttaagtcttc actatcgcca ccgagccgtt gcgtatcata ttctcattg ccggagcctt 120
 cttctggitg gtgtcactac tgatttcgtc cctcgttigg ttgatggcaa gactcattat 180
 tgacaacaac gatggaccga cacagaaata tctgcttacc tttggcgcgt ttgtgtctgt 240
 ctaaatccaa gatagttcc gctttgcata gtataaacta ttaaaaaatg ccagtgacgg 300
 tttgaagagt ataaaaccag gtgatacagc accttctatg cgctgctgg cataatgttc 360
 tggcttgggc tttggaatga tgagtgaggc atttctttt gtgaacacc tatccgactc 420
 cttagggcca ggtacagtgg gcatcctatg ggattctcca caattcttc tttattccgc 480

ttcatgacg cggtaatta tcttctgca tgccttcgg gggattgat tattgatgg 540
 ttgtgagaac aaaaagtggg gcatcctact tatcgttctc ctagaccacc tgcgtggtgc 600
 agcacagacc ttataagtt cctattatgg gataaaccta gcgicagctt ttataatcct 660
 ggtgctgaig ggcacatggg catttttagc tgccggaggc aggtgccgaa gactgaaact 720
 ttgcccgtctc tgccaagaga agaacttact tctttataac cagcgtcca gatagcctca 780
 ggaaccagc acttcccaaa ccgacagacta gatctttaga ggaagcacta ctgtgccctt 840
 tctgagaat ccttattct ggtgtaattg agacagaaat aagactatgc aaatagcgt 900
 tccaaaaaac aaaaaaaga aaaaa 925

<210> 34

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 34

gatgactgcg gccgigtat tcggctgigc cttcatcgcc ttcgggctg cgctagccct 60
 ttatgtctc accatcgcca cggagccgtt acgtatcatt ttccicacg ccggagcgtt 120
 cttctgattg gtgctctac tgatctcgtc cctggtttgg ttaatggcaa gtgtcattat 180
 cgacaacaag gatggaccaa cacagaatta tctgctcacc tttggggcgt ttgtatcgt 240
 ctatatcaa gacatgtcc ggtttgcata atataaacct ttaaaaaacg ccagtggagg 300
 ttgaaaagt ataatccag gtgacacagc accgtctatg cgactgctgg cttatgtttc 360
 cggcttgggg ttggaataa tgagiggigt atttccctt gtgaagacc tatcagactc 420
 ctttgggcca ggcacagigg ggatcctagg agattctct caattcttc tttatcggc 480
 tttcataacg ctggttatta tcttctgca tgtgttctgg ggaattgat tttttagtgg 540
 ctgtgagaag aaaaagtgag gcatcctct tatcgtctc ctagccacc tgcctagtgc 600
 agctcagacc ttataagtt cgtattatgg aataaacctt gcgtcagcct ttataatgct 660
 ggtgctaatt ggcacttggg cattcttagc tgcgggaggc agatgccgaa gctgaaact 720

ctgcctgctg tgccaagaaa agaactttct tctttacaac cagcgggtcca gataacctca 780
gggtaccagc acctcccaaa cggcagacta aatctttagt ggaagcacca ctgtgccgtt 840
ttctgaaaaat cccittttct ggtgcaattg agagagaaat aaaactatgc atatatgcgt 900
cccaaaaaag aaaaaaaaaa aaaaa 925

<210> 35

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 35

gatgactgcg gcagtgttct ttggctgctc cttcattgcg ttccggccag cgctcgctct 60
ttaigtcttc accatggcca ccgaaccgtt gcgtatcacc ttctctatcg cgggagcttt 120
attctgggtt gtgtctctcc tgatttcgtc ccttgtaagg ttcatgtcaa gagtcattat 180
tgagaacaaa gaaggaccaa ctacagaaata cctgctgatg ttggagcat ttgtctctgt 240
ctatatccaa gaaatgttcc gattagcata ttataaacct ttcaaaaaag cgagigaagg 300
attgaagagt ataaaccccg gtgagacggc accctcaatg cgacttctgg cctacgtttc 360
tgggttgggc ttaggaatca ttagtggagt cttttccttg gtgaatacac tatctgattc 420
cttgggcca ggcacggigg gcatacatgg agattctcct cacttcttcc tgtattcagc 480
attcatgact ctggatca tcttgctgca tgtattatgg ggcattgtat ttttcgatgg 540
ctgggagaag aaaaagtggg gtatcctcct catcgttctg ctgacccaac tgcctggttc 600
agccacaccc tcatgagtt ctttaataagg aattaacctg gcctcagcat tgataatcct 660
agtgtcatt ggcacctgcg cacttctggc tgcgggaggg agctgtcga gctcacaact 720
ctggctgctc tgacaagaca ataactttct cttttacaag cagcgtcaa gataacctca 780
gggaaccagc acttcgaaa ccgcagacta cttttttaga ggcagcaca cggtgccitt 840
atctgaaaaat cccittttct ggtggaagtg agaaagaaat aaaactatgc agatctgcgt 900
tccgaaaaaa aaaaaaaaaa ataaa 925

<210> 36

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 36

```
gatgactgcg gctgtgttct tcggctgctc gttcattgca ttccggcctg cgctcgcctt 60
ttaigtgttc accatagcca ccgatccgtt gcgcatcacc ttgctcatcg caggagcttt 120
tttctggttc gttgtctctc tgatttcacc ccttgtttgg ttcatcgcaa gaggatatt 180
tgaaaacaaa gatggaccaa ccagaaaata gctgctgata ttggagctt ttgtctccgt 240
ctatatgcaa gaaatattcc gatttgcata ttacaaactc ttgaaaaaag caagtgaagg 300
tttgaagagc ataaaccggg gtgagacagc accctctatg cgactcctgg cctaggtttc 360
tggattgggc ttggaaatca tcagtggagt gttttcctta gtgaatactc tatctgactc 420
cttggggcca ggcacagtgg gcattcatgg agactctcct cagttcttcc tataattcagc 480
tttcatgacc ctggtaiga tcttctaca tgtatttgg ggcacgtat ttttggatgg 540
ctgagagaag aataagtggg gcactcctct gatcgttcta ctgaccacc tgctggcttc 600
agcccagacc ttcataagtt cttattatgg aatcaacctg gcgtcagcat taataatcct 660
tgtctcacc ggcacctggg cttcttagc tgcgggtggc agctgccgaa gcctgaaact 720
ctgactgctc tgtcaagaca acaacttctt gccttacaaa cagcgtctca gataacceca 780
gggaacgagc acttcacaaa ccgtgacta catctttaga gggagcacia cagtgccttt 840
ttctgaaaac cctttttgt ggtggaaatg agaaagtaat aaaaccaatc agatgtgcgt 900
tccaaaaaaa aataaaaaaa acaaaa 925
```

<210> 37

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 37

```

gatgactgcg gccgigtct tgggctgccc attcattgct ttcgggcccg cgctcgcgct 60
ttaigtattc accattgccca ccgaccggtt gcggatcacc ttactcaccg ctggagcttt 120
cttctgggtg gtgctctacc tgatttcttc ccttgtctgg ttcattggcaa gagtaattat 180
tgataacaaa gacggaccac cgcagaaata actgctgatt ttgggagcct ttgtctcggc 240
ctatatacaa gaaattttcc gattcgcata ttagaaactc ttaaaaaaag ctatgaagg 300
cttgaagagg ataaaccagc gtgagactgc accctccatg cgactgctgg cctaagtttc 360
tggtttgggc ttcggaatca tgagtgaggt attttcttt gtgaataccc tatctgagtc 420
cttgggacca ggcactgtgg gcatccatgg agagtctcct caattcttcc tttattcagc 480
cttcatgacg ctggtcataa tcttgcctca tgtattctgg ggcatggtat ttttagatgg 540
ctgtgagaag aacaagtggg ggatcctcct aatcgttctt ctgaccacc tgctgggtgc 600
agcccaaac ttcatagtt ctactatgg aatgaacctg gcatcagcat ttataatcct 660
cgtgctcatg ggcacctgag catictttgc tgcggcggc agctggcgaa gcctaaaact 720
ctgtctgctc tgccaagaca agaactttct actttacaat cagcgtcca gataaccgca 780
gggaacaagc acttctcaaa ccgcccacta catgtttaga ggaagcaca ctgtgccttt 840
ctctgaaaaa cctttttttt ggtggaattg agaaagcaat aaaacgatgc agatattgct 900
tcctaaaaaa acaaaaaaaaa agaaa                                     925

```

<210> 38

<211> 925

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Sequence

<400> 38

```

gatgactgcg gccgigtct taggctgccc tttcattgcc ttcgggcccg cgctcgcact 60
ttaigttttc accatgccca ccgaccggtt gcgaatcacc tttctcaccg ccggagcttt 120
gttctgggta gtgctcttcc tgatttcttc ccttgtgtgg ttcattagcaa gaggattattat 180
tgacaacaaa gaggaccaca cacagaaata tctgctgacc tttggagcgt ttgtctcagt 240
ctatattcaa gaaatcttcc gattggcata ttaaaaactc tttaaaaaag ccagtgagg 300
gttgaagaga ataaaccctg gtgagaccgc accctcgaag cgactactgg cctatgtttc 360
tggcttgggc ttgggaatca taagtggagt ttttcttctc gtgaatacgc tatctgaatc 420
cttgggtcca ggcaccgtgg gcatgcattg agaatctcct catictctcc tctattcagc 480
gttcatgaca ctggtcatta tcttgcctca tgtattgtgg ggcatagtat tttttagatg 540
ctgcgagaag aagaagtggg gaatcctcct tatcgttctc ctgaccacc tgctgggtatc 600
agcccatacc ttcatcagtt cttagtatgg aataaacctg gcttcagcat tcataatcct 660
ggtgctcata ggcacctgtg catictctgc tgcggggggc agctgacgaa gccttaaac 720
ctgctgtctc tggcaagaca aaaactttct tctttacaac cagcgtcga gataaccaca 780
gggaactagc acttcccaaa ccgcccacta cataattaga ggtagcaca ccgtgccttt 840
gtctgaaaaa cctttttttt ggtggaactg agaaaggaat aaaacaatgc agatattgct 900
tcccaaaaaa aagaaaaaaaa aaaaa                                     925

```

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US01/14648 | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|--|--|---|---|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IPC(7) : G01N 33/53 US CL : 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Author search, Notch/APP Processing | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, Medline, Biosis | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 98/21328 A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER) 22 May 1998 (22.05.1998), instant SEQ ID NO:12 shares 100% similarity with U-2 OS clone | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | HP 0306, SEQ ID NO:24, nucleic acids, vectors, host cells, method of producing the polypeptide, antibodies and methods of use, see in particular pp. 1-91. | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 99/31236 A2 (GENSET) 24 June 1999 (24.06.99), instant SEQ ID NO:12 shares 62% similarity with SEQ IDN NO:169, nucleic acids, vectors, host cells, methods of producing the polypeptide, antibodies and assays using such, pp. 1-98. | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 99/06548 A2 (GENSET) 11 February 1999 (11.02.1999), instant SEQ ID NO:12 shares 89.1% similarity with SEQ ID NO:474 and 79.2% with SEQ ID NO:494, nucleic acids, vectors, host cells, methods of producing polypeptide, antibodies and methods of use, see in particular pp. 1-116. | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | | 1, 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: <table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:33%">*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="width:33%">*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> <td style="width:33%">*†* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> <td>*&* document member of the same patent family</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 claim or other special reason (as specified)</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></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> <td></td> </tr> </table> | | | *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 | *†* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | *B* earlier application or patent published on or after the international filing date | *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | *&* document member of the same patent family | *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) | | | *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | | *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| *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 | *†* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention | | | | | | | | | | | | | | | |
| *B* earlier application or patent published on or after the international filing date | *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art | *&* document member of the same patent family | | | | | | | | | | | | | | | |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 27 September 2002 (27.09.2002) | | Date of mailing of the international search report 29 November 2002 (29.11.02) | | | | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230 | | Authorized officer <i>Gregory Kuntz</i> Telephone No. (703) 305-1235 | | | | | | | | | | | | | | | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US01/14648 |
|---|-------------------------------------|---|
| 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. | <input type="checkbox"/> | Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: |
| 2. | <input type="checkbox"/> | 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. | <input checked="" type="checkbox"/> | Claim Nos.: 8-24, 26-28, 30, 31, to the extent of claim 30, and 35-42 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule |
| 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: | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. |
| 3. | <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: |
| 4. | <input checked="" type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 4 in part |
| Remark on Protest | <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. |
| | <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

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 Q 1/02 | C 1 2 Q 1/02 | Z N A |
| G 0 1 N 33/15 | G 0 1 N 33/15 | Z |
| G 0 1 N 33/50 | G 0 1 N 33/50 | Z |
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/53 | D |
| G 0 1 N 33/566 | G 0 1 N 33/566 | |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72) 発明者 フランシス, ジョージ, ロス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 3 - 0 5 1 1, サウス サンフランシスコ, ハーバー
 ウェイ 1 7 0, ピー.オー.ボックス 5 1 1 エクセリクシス, インコーポレイテッド内
- (72) 発明者 エリス, マイケル, クリストファー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 3 - 0 5 1 1, サウス サンフランシスコ, ハーバー
 ウェイ 1 7 0, ピー.オー.ボックス 5 1 1 エクセリクシス, インコーポレイテッド内
- (72) 発明者 ラディ, デービッド, アンドリュウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 3 - 0 5 1 1, サウス サンフランシスコ, ハーバー
 ウェイ 1 7 0, ピー.オー.ボックス 5 1 1 エクセリクシス, インコーポレイテッド内
- (72) 発明者 ニコル, シャーモン, モニーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 3 - 0 5 1 1, サウス サンフランシスコ, ハーバー
 ウェイ 1 7 0, ピー.オー.ボックス 5 1 1 エクセリクシス, インコーポレイテッド内
- (72) 発明者 マグラス, ガース, ジェセフ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 3 - 0 5 1 1, サウス サンフランシスコ, ハーバー
 ウェイ 1 7 0, ピー.オー.ボックス 5 1 1 エクセリクシス, インコーポレイテッド内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 HA11 HA17
 4B063 QA06 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX02
 4B064 AG20 CA19 CC24 DA01 DA13
 4C084 AA17 NA14 ZA162
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA50 DA50 EA20 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 早老素增强子 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004522408A | 公开(公告)日 | 2004-07-29 |
| 申请号 | JP2001582501 | 申请日 | 2001-05-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | エクセリクスインコーポレイテッド | | |
| 申请(专利权)人(译) | Exelixis公司, 公司 | | |
| [标]发明人 | カーティスダニエルティム フランシスジョージロス エリスマイケルクリストファー ラディデービッドアンドリユー ニコルシャーモンモニーク マグラスガースジェセフ | | |
| 发明人 | カーティス,ダニエル,ティム フランシス,ジョージ,ロス エリス,マイケル,クリストファー ラディ,デービッド,アンドリユー ニコル,シャーモン,モニーク マグラス,ガース,ジェセフ | | |
| IPC分类号 | G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P25/28 C07K14/47 C07K14/705 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 | | |
| CPC分类号 | A61K38/00 A61P25/28 C07K14/4705 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A A61K45/00 A61P25/28 C07K14/705 C12P21/02.C C12Q1/02.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA06 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA162 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA50 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 09/568942 2000-05-05 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了涉及具有笔特异性结构和活性的笔多肽，有关笔功能的多核苷酸和调节剂的方法和组合物。本发明提供了能够与天然笔基因，笔特异性结合剂如特异性抗体特异性杂交的分离的笔杂交探针和引物，以及在诊断（例如笔转录本的遗传杂交筛选），治疗中制备和使用本发明组合物的方法。（例如用于调节APP处理的笔抑制剂）和生物制药行业（例如，作为免疫原，用于筛选化学库中主要药理试剂的试剂等）。

| 親 pen | 天然源 | 配列番号 | BLASTによる ヒト親 pen に対する %同一性 |
|--------|--|------------|----------------------------------|
| pen-1 | 線虫 キイロショウジョウバエ オオタバコガ(H. virescens) マウス ヒト | (配列番号: 1) | 28.7 |
| | | (配列番号: 2) | 45.4 |
| | | (配列番号: 3) | 50 |
| | | (配列番号: 4) | 92.8 |
| | | (配列番号: 5) | 100 |
| pen-1B | ヒト | (配列番号: 6) | 51 (ヒト親 pen-1 に対する同一性) |
| pen-2 | 線虫 キイロショウジョウバエ ラット マウス ウシ ヒト | (配列番号: 7) | 42.6 |
| | | (配列番号: 8) | 60.4 |
| | | (配列番号: 9) | 96 |
| | | (配列番号: 10) | 96 |
| | | (配列番号: 11) | 95 |
| | | (配列番号: 12) | 100 |
| Aph-2 | 線虫 キイロショウジョウバエ ヒト | (配列番号: 13) | 18.9 |
| | | (配列番号: 14) | 29.9 |
| | | (配列番号: 15) | 100 |