

(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2004-500028

(P2004-500028A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(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	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/00	4 B O 6 5
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 202 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-504001 (P2001-504001)	(71) 出願人	501456788
(86) (22) 出願日	平成12年6月9日 (2000.6.9)		ディジタル・ジーン・テクノロジーズ・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成13年12月10日 (2001.12.10)		アメリカ合衆国カリフォルニア州90237, ラ・ホラ, ノース・トーレイ・パインズ・ロード 11149, スイート 110
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/015973		
(87) 国際公開番号	W02000/077166	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成12年12月21日 (2000.12.21)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/138,487	(74) 代理人	100071124
(32) 優先日	平成11年6月10日 (1999.6.10)		弁理士 今井 庄亮
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 胃腸炎における遺伝子発現調節

(57) 【要約】

胃腸炎で調整される遺伝子特性に関連するポリヌクレオチド、ポリペプチド、キット及び方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離核酸分子で、その分子が、

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61およびSEQ ID NO:62

から構成される群から選択されるポリヌクレオチドからなることを特徴とする単離核酸分子。

【請求項2】

単離ポリペプチドで、そのポリペプチドが、

SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61およびSEQ ID NO:62

から構成される群から選択されるポリヌクレオチドによりコードされることを特徴とする単離ポリペプチド。

【請求項3】

請求項 1 の単離核酸分子と少なくとも 95% 同一のポリヌクレオチドからなる単離核酸分子。

【請求項 4】

ストリンジェントな条件下で請求項 1 の単離核酸分子とハイブリッド形成できる少なくとも 10 個の塩基の単離核酸分子。

【請求項 5】

請求項 2 のポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項 6】

請求項 2 のポリペプチドのフラグメントをコードする単離核酸分子。

【請求項 7】

請求項 2 のポリペプチドのポリペプチドエピトープをコードする単離核酸分子。

【請求項 8】

請求項 2 のポリペプチドにおいて、ポリペプチドが生物活性をもつことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 9】

請求項 2 のポリペプチドの種の相同体をコードする単離核酸。

【請求項 10】

請求項 1 の単離核酸分子において、ヌクレオチド配列が C 末端又は N 末端のいずれかから連続的なヌクレオチドの欠失を有することを特徴とする単離核酸分子。

【請求項 11】

請求項 1 の単離核酸分子を含む組換えベクター。

【請求項 12】

請求項 1 の単離核酸分子を含む組換え宿主細胞。

【請求項 13】

請求項 12 の組換え宿主細胞を作成する方法。

【請求項 14】

ベクター配列を含む請求項 12 の組換え宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 2 の単離ポリペプチドにおいて、単離ポリペプチドが C 末端又は N 末端のいずれかから連続的なアミノ酸欠失を有することを特徴とする単離ポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 2 の単離ポリペプチドに特異的に結合する単離抗体。

【請求項 17】

請求項 16 の単離抗体において、抗体が単クローン性抗体であることを特徴とする単離抗体。

【請求項 18】

請求項 16 の単離抗体において、抗体が多クローン性抗体であることを特徴とする単離抗体。

【請求項 19】

請求項 2 の単離ポリペプチドを発現する組換え宿主細胞。

【請求項 20】

単離ポリペプチドで、そのポリペプチドが、

(a) 前記ポリペプチドが発現されるような条件で請求項 14 の組換え宿主細胞を培養する工程、および

(b) ポリペプチドを分離する工程、

により製造されることを特徴とする単離ポリペプチド。

【請求項 21】

医学的状态を予防、治療又は改善するための方法で、その方法が請求項 2 のポリペプチド又は請求項 1 のポリヌクレオチドの治療効果のある量を哺乳動物の患者に投与する工程からなることを特徴とする方法。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

患者の病理的状态又は病理的状态への感受性を診断するための方法で、その方法が、

(a) 請求項 1 のポリヌクレオチドの変異の有無を判断する工程と、

(b) 前記変異の有無に基づいて病理的状态又は病理的状态への感受性を診断する工程と、
からなることを特徴とする診断方法。

【請求項 2 3】

患者の病理的状态又は病理的状态への感受性を診断するための方法で、その方法が、

(a) 生物サンプルにおいて請求項 2 のポリペプチドの存在又は発現の量を判断する工程と、

(b) ポリペプチドの存在又は発現の量に基づいて、病理学的状态又は病理学的状态への感受性を診断する工程と、
からなることを特徴とする診断方法。

【請求項 2 4】

請求項 2 のポリペプチドの結合パートナーを同定するための方法で、その方法が、

(a) 請求項 2 のポリペプチドと結合パートナーを接触する工程と、

(b) 結合パートナーがポリペプチドの活性に影響を与えるかどうかを判断する工程と、
からなることを特徴とする同定方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 の単離核酸分子の c D N A 配列に対応する遺伝子。

【請求項 2 6】

生物学的検定法によって、発現したポリペプチドの活性を同定するための方法で、その方法が、

(a) 細胞において請求項 2 のポリペプチドを発現させるための工程と、

(b) 発現したポリペプチドを分離する工程と、

(c) 発現したポリペプチドの活性を生物学的検定法で試験する工程と、

(d) 試験結果に基づいて発現したポリペプチドの活性を同定する工程と、
からなることを特徴とする同定方法。

【請求項 2 7】

表 1 に特定する D N A 分子からなる群から選択され、デジタルアドレスに記載した 5 ' 側の部分的ヌクレオチド配列および長さを持ち、胃腸炎に特徴的な調節パターンをもつ、胃腸炎において調節される遺伝子のプローブとして用いるのに適した実質的に純粋な単離 D N A 分子。

【請求項 2 8】

哺乳動物の組織サンプルにおいて請求項 2 のポリヌクレオチドの存在を検出するのに適したキットで、そのキットが、請求項 1 のポリヌクレオチドに対応する遺伝子がコードする哺乳動物の蛋白又は請求項 2 のポリペプチドと免疫反応する第 1 の抗体の少なくとも 1 回の検定に十分な量と、使用マニュアルと、適切な梱包材料とを含むことを特徴とするキット。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 のキットがさらに第 1 の抗体と結合する第 2 の抗体を含むことを特徴とするキット。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 のキットにおいて、第 2 の抗体が標識されていることを特徴とするキット。

【請求項 3 1】

請求項 3 0 のキットにおいて、標識が、酵素、放射性同位体、蛍光成分、コロイド金属、化学発光成分、りん光性成分、又は生物発光成分からなることを特徴とするキット。

【請求項 3 2】

胃腸炎において調節される遺伝子の存在を検出するのに適したキットで、そのキットが、少なくとも 1 回の検定に十分な量の、請求項 1 又は 4 の少なくとも 1 つのポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドあるいは少なくとも10の連続塩基を有するそのフラグメントと、
標識手段と、
使用マニュアルと、
適切な梱包材料と、
を含むことを特徴とするキット。

【請求項33】

単離ポリペプチドで、そのポリペプチドがSEQ ID NO: 129からなることを特徴とする単離ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

関連出願の参照

本出願は、参考により本発明に組込まれる、1999年6月10に提出された米国仮出願 S. N. 60/138, 487の優先権を主張する。

発明の背景

慢性的な炎症性腸疾患 (IBD) は医学的に頑固な問題の一つである。IBDの主要な2つのタイプは、口から肛門まで消化管全体に影響する可能性を持つクローン病 (CD) と大腸のみに影響する潰瘍性大腸炎 (UC) である。

【0001】

CDとUCはともに腸管炎症から発生する大きい原腸管損傷により特徴付けられるが、これらの病気はまったく別である。肉眼的検査では、これらの病気を区別する最善の特徴はUCが1) 連続的な炎症性異常、2) 主として結腸と直腸の粘膜に限定される、3) 通常主として血管に関し、また4) 通常結腸の著しい短縮を伴うのに対して、CDの炎症はほぼ常に不連続であり、また大腸や小腸の何処にでも発生する可能性がある。CDでは粘膜は通常“丸石”のように見え、また内腔の狭窄と狭縮を伴う腸壁の亀裂と腫上りがある。

【0002】

顕微鏡的には、UCは基本的に粘膜の表面的炎症であり、また慢性疾患でもm u s c u l a r i s p r o p r i aと漿膜は炎症性浸潤から免れる。逆に、CDは顕微鏡的には、粘膜と粘膜下組織を通じて筋肉層内に広がる経壁的炎症を呈する。UCでは、小窩 (c r y p t) 膿瘍と上皮の破壊がよく起こるのに対して、CDでは有益な診断特徴は類肉腫タイプの肉芽腫の存在である。

【0003】

これらの病気の療法の組織学特徴はIBDにはリンパ球様組織の調節異常 (d y s r e g u l a t i o n) がある。免疫学的調節異常がIBDの一次原因であるかどうか又は炎症性応答が上皮障壁内の裂け目など別の粘膜発作に二次的であるかどうかは不明のままである。

【0004】

ここ数年の発達にもかかわらず、CDとUCの正確な病因と病原は未定義にとどまる。IBDの機械論的基礎を試み且つよりよく理解するため、多大の努力が炎症性腸疾患の種々の動物モデルの発見と開発の方向で行われている。腸の炎症を研究するための最善の特徴的システムはデキシトラン・ナトリウム硫酸 (DSS) 誘導大腸炎のマウス・モデルである (I. Okayasu等、胃腸病学98: 694702、1990年; H. S. Cooper等、実験室研究69: 238-249、1993年; L. A. Dieleman等、胃腸病学107: 1643-1652、1994年; C. O. Elson等、胃腸病学109: 1344-1367、1995年)。

【0005】

DSSは上皮の密着結合内に裂け目を引起すと考えられ (J. Ni等、腸39: 234-241、1996年)、よって腸内腔の膨大な抗原性負荷がその下にある組織と直接接触するのを可能にする。その一つの結果として、腸内腔に位置付けられた抗原に向けられた活発な免疫応答がDSS処置されたマウス達の中で開始される。腸炎症は一次的には大腸に限定される。

【0006】

D S S 誘導の大腸炎モデル・システムは以下を検査するのに使用される (i) 上皮損傷への初期応答の性質、(i i) 炎症部位への細胞の動員に責任のあるメカニズム、(i i i) 腸炎症の高さでの保護免疫応答の性質及び (i v) 回復を誘導した損傷した組織の修復を起動するメカニズム。このモデル・システムは I B D の誘導と回復のメカニズムを検査するのに使用できた腸損傷を修飾又は防止するか又は粘膜の回復を刺激することのできる遺伝子／タンパク質の識別を助けるはずである。

【0007】

これらのプロセスに寄与する要因の多様性に鑑み、I B D の諸段階で関与する新しいタンパク質の役割の発見、識別及び解明が必要なことは明らかである。

D S S 誘導大腸炎の特徴

D S S 誘導大腸炎モデル・システムでは、4日目からマウス達の体重損失が明白になる。腸の組織学的分析は上皮細胞とさかずき細胞の欠失により識別可能な初期の不規則な病変の存在を示す。8日目には、体重損失が顕著になり(約20%の減少)、マウス達は瀕死状態に陥る。組織学的には、腸上皮はこの段階でほぼ完全に破壊される。固有層と粘膜下組織内への大きな混合炎症性細胞浸潤の証拠がある。炎症性細胞浸潤物は主としてT細胞、B細胞及び顆粒球で構成されるように思われる。12日目には、マウス達が回復するにつれて体重増加が明らかになる。この後の段階では、小窩(crypt)回復と上皮再生は、修復プロセスの開始の組織学的証拠を提供する。

D S S 誘導大腸炎と人間の I B D

D S S 誘導大腸炎での一次的事象は上皮細胞の損傷であり、二次的事象としての免疫の活性化を伴う炎症である。上皮細胞の損傷又は免疫の調節異常が人間の I B D での開始事象であるかどうかは明白でない。D S S 誘導大腸炎モデルは従って、両プロセスの発達と結果を研究する機会を提供することに於いて有益である。

発明の概要

D S S 処置により調節される遺伝子に相当する分子が識別された。斯かる分子は I B D 及びその他の腸の病理学の処置での治療、予後及び診断使用に於いて有益である。本発明は新しいポリヌクレオチドと暗号化されたポリペプチドを提供する。その上、本発明は、それらのポリヌクレオチドやポリペプチドを生成するためのベクター、宿主細胞、抗体、及び、組換え方法に関係する。又、ポリペプチドとそれらを暗号化するポリヌクレオチドに関連した疾患を検出するための診断方法、及び斯かる疾患を処置するための治療方法もまた提供される。発明はさらにポリペプチドの結合相手を識別するためのスクリーニング方法にも関係する。

【0008】

本発明は新しいポリヌクレオチドと暗号化されたポリペプチドを提供する。その上、本発明はそれらのポリヌクレオチドとポリペプチドを生成するためのベクター、宿主細胞、抗体、及び組換え方法に関係する。それらのポリペプチドとそれらを暗号化するポリヌクレオチドに関係する疾患を検出するための診断方法、及び斯かる疾患を処置するための治療方法も提供される。発明はさらにポリペプチドの結合相手を識別するためのスクリーニング方法にも関係する。

【0009】

一つの実施態様では、発明は以下で構成されるグループから選択されたポリヌクレオチド1個を含む分離された核酸分子を提供する：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, S

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61とSEQ ID NO: 62。もう一つの実施態様はSEQ ID NO: 1-62の核酸分子に少なくとも95%同一の分離された核酸分子1個を含む。さらなる実施態様は厳格な条件下でSEQ ID NO: 1-62の分離された核酸分子に雑種形成される分離された核酸分子1個を少なくとも10個の塩基の長さの中に含む。

【0010】

もう一つの実施態様は、以下で構成されるグループから選択されたポリヌクレオチドにより暗号化された分離されたポリペプチドを提供する：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61とSEQ ID NO: 62。もう一つの実施態様では、発明は本発明のポリペプチドを暗号化する分離された核酸分子を提供する。

【0011】

さらなる実施態様では、発明はそれらのデジタル・アドレスにより記述された5'部分ヌクレオチド配列と長さを持ち、且つ消化管炎症中に特徴的な調節パターンを持つ第1表に識別されたDNA分子で構成されるグループから選択された、消化管炎症中の調節された遺伝子用のプローブとして使用するのに適した実質的に純粋な分離されたDNA分子を提供する。

【0012】

本発明はまた、消化管炎症中に調節された遺伝子の存在を検出するためのシステムと方法も提供する。一つの実施態様では、本発明は少なくとも1回の効力検定用に充分量で本発明のポリヌクレオチドを少なくとも1個、又は少なくとも10個の隣接塩基を有するその断片；標識手段；使用のための指示；及び適切なパッケージ材料を含んでいる、消化管炎症中に調節された遺伝子の存在を検出するのに適したキットを提供する。ひとつの実施態様では、ポリヌクレオチドは以下で構成されるグループから選択される：SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61とSEQ ID NO: 62。もう一つの実施態様はSEQ ID NO: 1-62の分離された核酸分子に少なくとも95%同一なポリヌクレオチドを含む。さらなる実施態様は厳格な条件下でSEQ ID NO: 1-62の分離された核酸分子に雑種形成される少なくとも10個の塩基の長さのポリヌクレオチドを含む。さらにもう一つの実施態様では、ポリヌクレオチドはそれらのデジタル・アドレスにより記述された5'部分ヌクレオチド配列と長さを持ち、且つ消化管炎症中に特徴的な調節パターンを持つ第1表に識別されたDNA分子で構成されるグループから選択される。

望ましい態様の詳細な説明

定義

以下の定義は本仕様を通じて使用されている特定の語句の理解を助けるために提供される。

【0013】

本発明に於いて、“分離された”はその本来の環境（例：それが自然に発生する場合の自然環境）から取除かれた材料を言い、よってまたその自然な状態から“人間”の手で変更されている。例えば、分離されたポリヌクレオチドはベクター又は物質組成の一部であり得、あるいは細胞内に含まれることがあり、またそのベクター、物質組成や特定細胞がそのポリヌクレオチドの本来の環境でないゆえにさらに“分離される”こともあり得る。

【0014】

本発明に於いて、“分泌された”タンパク質とはER、分泌小胞、又は信号配列の結果としての細胞外空間に導かれる可能性があるこれらのタンパク質を言う。ならびにこれらのタンパク質は、必ずしも信号配列を含む必要のない細胞外空間に放出される。分泌されたタンパク質が細胞外空間に放出される場合、分泌されたタンパク質は“成熟した”タンパク質を生成するため細胞外処理を受ける可能性がある。細胞外空間への放出は細胞外排出

作用やタンパク分解分割を含む多くのメカニズムにより起こり得る。

【0015】

本発明で使用する時、“ポリヌクレオチド”はSEQ ID NO: 1-62に含まれる核酸配列を持つ分子を言う。例えば、ポリヌクレオチドは、5'と3'不翻訳配列、信号配列付き又はなしのコード領域、分泌されたタンパク質コード領域、ならびに断片、エピトープ、ドメイン、及び変種の核酸配列を含む、全長cDNA配列のヌクレオチド配列の全部又は一部を含むことができる。その上、本発明で使用する時、“ポリペプチド”は広義のポリヌクレオチドから生成された翻訳済みのアミノ酸配列をもつ分子を言う。

【0016】

本発明の“ポリヌクレオチド”はまた、厳格な雑種形成条件での、SEQ ID NO: 1-62、又はその補体、あるいはcDNAに含まれる配列に雑種形成可能であるようなポリヌクレオチドを含む。“厳格な雑種形成条件”とは50%のホルムアミド、5x SSC (750 mMのNaCl、75 mMのクエン酸ナトリウム)、50 mMの燐酸ナトリウム (pH 7.6)、5x Denhardt's 溶液、10%のデキストラン硫酸、及び20 µg/mlの変性しせん断したサケの精子DNAを含む溶液中で42℃で一晩培養してから、約65℃で0.1x SSC中でフィルターを洗浄することを言う。 10

【0017】

より低い厳格さの雑種形成条件で本発明のポリヌクレオチドに雑種形成する核酸分子もまた意図される。雑種形成と信号検出の厳格さの変更は主としてホルムアミド濃度 (ホルムアミド・パーセントの低下は厳格さの低下を引起す) ; 塩条件、又は温度の操作を通じて行われる。例えば、より低い厳格さの条件は、6x SSPE (20x SSPE = 3M NaCl ; 0.2M NaH₂PO₄ ; 0.02M EDTA、pH 7.4)、0.5%のSDS、30%のホルムアミド、100 µg/mlのサケの精子遮断DNAを含む溶液中で37℃での一夜の培養に続いて、1x SSPE、0.1 SDSで50℃での洗浄を含む。加えて、さらに低い厳格さを達成するには、厳格な雑種形成に続いて行う洗浄をより高い濃度の塩 (例: 5x SSC) で行うことができる。 20

【0018】

上述の条件の変化は雑種形成実験に於いて背景を抑制するのに使用される別の遮断試薬の包含及び/又は置換を通じて行えることに注意する。代表的な遮断試薬にはDenhardt's 試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性されたサケの精子DNA、及び市販の特許製品が含まれる。特定の遮断試薬の包含は適合性の問題に起因して、上述の雑種形成条件の変更を要する可能性がある。 30

【0019】

勿論、ポリA+配列 (任意の3'末端のポリA + 配列リンスティングに示された1個のcDNAの道)、又はT (又はU) 残基の補完的伸張にのみ雑種形成するポリヌクレオチドは“ポリヌクレオチド”の定義に含まれないであろう。何故なら、斯かるポリヌクレオチドはポリ(A)伸張やその補体 (例: 実質的に任意の二本鎖cDNAクローン) を含む任意の核酸分子に雑種形成するからである。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドは無修飾のRNAやDNA又は修飾されたRNAやDNAであり得る任意のポリリボヌクレオチドやポリデオキシリボ核酸で構成され得る。例えば、ポリヌクレオチドは単鎖と二本鎖DNA、単鎖と二本鎖領域の混合であるDNA、単鎖と二本鎖RNA、及び単鎖と二本鎖領域の混合であるRNA、単鎖又はより代表的には二本鎖又は単鎖と二本鎖領域の混合であるDNAとRNAを含んでいる雑種分子で構成され得る。加えて、そのポリヌクレオチドはRNAかDNA又はRNAとDNAの両方を含んでいる三本鎖領域で構成され得る。ポリヌクレオチドはまた、1個又は複数の修飾された塩基、又は安定のためか他の理由により修飾されたDNAかRNAバックボーンを含むこともできる。“修飾された”塩基には、例えば、イノシンなどのトリチル化された塩基及びイノシンなどの特殊な塩基が含まれる。DNAとRNAには多様な修飾を行うことができ、 40 50

このようにして、“ポリヌクレオチド”は化学的に、酵素又は代謝につき修飾された形を包含する。

【0021】

本発明のポリペプチドはペプチド結合又は修飾ペプチド結合、即ちペプチド同配体、により互いに結合されたアミノ酸で構成され、また20 - 遺伝子暗号化されたアミノ酸以外のアミノ酸を含むことができる。そのポリペプチドは翻訳後処理などの自然のプロセスか、又は従来技術で良く知られている化学的修飾かのいずれかにより修飾することができる。斯かる修飾は、基本的文献及びより詳細な学術論文、ならびに大量の研究文献に充分説明されている。修飾はペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖及びアミノ - やカルボキシル - 末端を含め、ポリペプチドの何処に於いても起こり得る。与えられたポリペプチドの中で同じタイプの修飾が同じ又は異なる度合いで複数の部位に存在し得ることが理解されよう。また、一つの与えられたポリペプチドは多数のタイプの修飾を含み得る。ポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝され得、また分枝付き又は分枝なしの環状であり得る。環状、分枝付き、及び分枝付き環状のポリペプチドは翻訳後の自然プロセスの結果として生じるか又は合成方法により作ることができる。修飾にはアセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有付加、ヘム成分の共有付加、ヌクレオチドやヌクレオチド派生物の共有付加、脂質や脂質派生物の共有付加、phosphotidylnositolの共有付加、架橋結合、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、処方、ガンマ・カルボキシル化、グルコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスティル化、酸化、pegylation、タンパク質分解処理、ホスホリル化、プレニル化、ラセミ化、selenoylation、硫酸化、アルギニル化などタンパク質へのアミノ酸の転移RNA仲介添加、及びユビキチン化が含まれる。（例えば、タンパク質 - 構造と分子特性、第2版、T. E. Creighton、W. H. Freeman and Company、ニューヨーク（1993年）；タンパク質の翻訳後の共有付加修飾、B. C. Johnson、Ed. , Academic Press、ニューヨーク、1~12ページ（1983年）；Seifter等、Meth Enzymol 182: 626 - 646（1990年）；Rattan等、Ann NY Acad Sci 633: 48 - 62（1992年）を参照）。

【0022】

“生物学的活動度を有するポリペプチド”は、用量に依存して又は依存せずに、特定の生物学的検定で測定された成熟形を含む本発明のポリペプチドの活動度に、必ずしも同一である必要はないが、同様の活動度を示すポリペプチドを言う。用量依存性が存在する場合、それはポリペプチドのそれと同一である必要はないが、むしろ本発明のポリペプチドと比較して与えられた活動度での用量依存に実質的に同様である必要がある（即ち、候補ポリペプチドは本発明のポリペプチドに比較してより大きい活動度か又は約25倍少ない活動度以下、また望ましくは、約10倍少ない活動度以下、またより望ましくは、3倍少ない活動度以下を示すであろう）。

【0023】

既知の分子生物学技術を使用して他の読み枠もまた簡単に翻訳できるけれども、メチオニンに始まる翻訳されたアミノ酸配列が識別される。それらの代用の開放読み枠の翻訳により生成されたポリペプチドが本発明により特異的に意図される。

【0024】

SEQ ID NO: 1-62とSEQ ID NO: 1-62の翻訳は従来技術でよく知られた以下に詳述される様々の使用にとって充分正確であり、またさもなければ適している。これらのプローブはまた生物学的試料内で核酸分子に雑種形成し、それにより発明の様々の法的及び診断方法を可能にする。同様に、SEQ ID NO: 1-62の翻訳から識別されるポリペプチドは、識別されたcDNAクローンにより暗号化された分泌タンパク質に特異的に結合する抗体を生成する。

【0025】

しかしながら、DNA配列決定反応により生成されるDNA配列は配列決定エラーを含む可能性がある。エラーは識別間違いのヌクレオチドとして、あるいは生成されたDNA配列へのヌクレオチドの挿入又は欠失として存在する。間違って挿入又は欠失されたヌクレオチドは予想のアミノ酸配列の読み枠内にフレームシフトを引起す。これらの場合、たとえば生成されたDNA配列が実際のDNA配列に99.9%以上同一であるとしても、予想のアミノ酸配列は実際のアミノ酸配列から相違する（例えば、1000塩基以上の開放読み枠内での1個の塩基の挿入や欠失）。

【0026】

本発明はまたSEQ ID NO: 1-62、及びSEQ ID NO: 1-62の翻訳
10 に対応する遺伝子にも関係する。対応する遺伝子は本発明で開示される配列情報を使用して既知の方法に従って分離することができる。斯かる方法は開示された配列からのプローブやプライマーの作成、及びゲノム物質の適切な発生源からの対応する遺伝子の識別や増殖を含む。

【0027】

本発明に於いては同族の種も提供される。同族の種は本発明で提供される配列から適切なプローブやプライマーを調整して、希望する同族の適切な核酸発生源をスクリーニングすることにより分離及び識別することができる。

【0028】

発明のポリペプチドは任意の適切な方法で調整することができる。斯かるポリペプチドは
20 分離された自然発生のポリペプチド、組換えにより生成されたポリペプチド、合成により生成されたポリペプチド、又はこれらの方法の組合せにより生成されたポリペプチドを含む。斯かるポリペプチドを調整する手段は技術で十分理解されている。

【0029】

ポリペプチドは成熟した形を含む分泌されたタンパク質の形、あるいは融合タンパク質（下記を参照）などのより大きなタンパク質の一部であり得る。分泌又はリーダー配列、前駆配列、ヒスチジン残基などの精製を助ける配列を含む追加のアミノ酸配列、又は組換え生成中の安定化用の追加の配列を含めると有利であることがよくある。

【0030】

本発明のポリペプチドは望ましくは分離された形で提供され、また望ましくは実質的に精
30 製される。分泌タンパク質を含むポリペプチドの組換え生成バージョンは、SmithとJohnsonの遺伝子67: 31-40（1988年）で説明されているワン・ステップ方法により実質的に精製することができる。発明のポリペプチドはまた、従来技術でよく知られた方法に於いて分泌タンパク質に対して作られる本発明の抗体を使用して自然の又は組換えの発生源から精製することもできる。

【0031】

信号配列

タンパク質が信号配列を持つかどうか、ならびに開裂点を予想する方法は存在する。例え
40 ば、McGeochの方法、ウィルス研究3: 271-286（1985年）は、完全な（未開裂の）タンパク質の短いN末端を電荷された領域とそれに続く電荷なしの領域からの情報を使用する。von Heinejeの方法、核酸研究14: 4683-4690（1986年）は開裂部位周辺の残基、代表的には-13から+2の残基からの情報を使用し、ここで+1は分泌されたタンパク質のアミノ末端を意味する。従って、推論されたアミノ酸配列から信号配列と成熟配列を識別することができる。

【0032】

ポリヌクレオチドとポリペプチドの変種

“変種”とは、本発明のポリヌクレオチドやポリペプチドとは異なるがその基本的特性を保持しているポリヌクレオチドやポリペプチドを言う。一般的に、変種は全体として極めて同様であり、且つ、多くの領域に於いて、本発明のポリヌクレオチドやポリペプチドと同一である。

【0033】

“同一性”はそれ自体、技術で認知された意味を持ち、また公表された技術で計算可能である。（例として、計算分子生物学、Lesk, A. M.、ed. オックスフォード大学出版、ニューヨーク（1988年）；生物計算：情報科学とゲノム・プロジェクト、Smith, D. W. ed. アカデミック出版、ニューヨーク（1993年）；配列データのコンピュータ分析、第1部、Griffin, A. M.とGriffin, H. G.、eds. ヒューマナ出版、ニュージャージー（1994年）；分子生物学に於ける配列分析、von Heinje, G.、アカデミック出版（1987年）；及び配列分析プライマー、Gribnikov, M.とDevereux, J.、eds.、Mストックトン出版、ニューヨーク（1991年）を参照）。2つのポリヌクレオチドやポリペプチド配列の間の同一性を測定する多数の方法が存在する一方、“同一性”の語句は熟練した技術者にはよく知られている。（Carillo, H.とLipton, D.、SIAM J応用数学48:1073（1988年））

二つの配列の間の同一性又は同類性を決定するのに普通採用される方法は、“大型コンピュータへのガイド”Martin J. Bishop、ed. アカデミック出版、サンディエゴ（1994年）、及びCarillo H.とLipton, D.、SIAM J応用数学48:1073（1988年）で開示されたものを含むがこれに制限されない。ポリヌクレオチドやポリペプチドをアラインメントするための方法は以下を含むコンピュータ・プログラムで暗号化されている：GCGプログラム・パッケージ（Devereux, J.等、核酸研究（1984年）12（1）：387（1984年））、BLASTP、BLASTIN、FASTA（Atschul, S. F.等、分子生物学ジャーナル215:403（1990年））、Bestfitプログラム（ウィスコンシン配列分析パッケージ、Unix用バージョン8、遺伝子コンピュータ・グループ、University Research Park、575 Science Drive、マディソン、WI 53711（SmithとWatermanの局所的相同アルゴリズムを使用）、応用数学の進歩2:482-489（1981年））。

【0034】

ある配列が、例えば、基準配列に95%同一であるかどうか決定するため何らかの配列アラインメント・プログラムを使用するとき、同一性のパーセントが基準配列の全長にわたって計算されるように且つ基準配列のヌクレオチド総数の5%までの同一性のギャップが許容されるようにパラメータが設定される。

【0035】

大域配列アラインメント（global sequence alignment）とも言われる、疑問のある配列（query sequence）（本発明の配列）と主配列（subject sequence）の間の最善の全体的一致を決定するための望ましい方法は、Btutlag等のアルゴリズム（コンピュータ応用生物科学6:237-245（1990年））に基づくFASTDBコンピュータ・プログラムを使用して決定できる。“配列”の語句はヌクレオチドとアミノ酸の配列を含む。配列のアラインメントに於いて、疑問のある配列と主配列は両方ともヌクレオチド配列か又は両方ともアミノ酸配列かのいずれでも良い。前述の大域配列アラインメント（global sequence alignment）の結果は同一性のパーセントである。同一性パーセントを計算するためのDNA配列のFASTDB探索で使用する望ましいパラメータは以下である：Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、及びCutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、及びWindow Size=500か又はヌクレオチド塩基中の疑問のある配列長さのいずれか短い方。アミノ酸アラインメントの同一性と相似性パーセントを計算するのに採用される望ましいパラメータは以下である：Matrix=PAM 150、k-tuple=2、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=20、Randomization

Group Length=0、及びCutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty=0.05、及びWindow Size=500か又はアミノ酸残基中の疑問のある配列長さのいずれか短い方。

【0036】

説明として、SEQ ID NO: 1-62に含まれる1配列に少なくとも95%の“同一性”のヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドとは、そのポリヌクレオチド配列が全長の各100ヌクレオチド当たり（与えられた100ヌクレオチド伸張内だけではない）5ポイントの突然変異までを含む可能性のあることを除きSEQ ID NO: 1-62に含まれる配列又はcDNAに同一であることを意味する。換言すれば、SEQ ID NO: 1-62に少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを得るには、SEQ ID NO: 1-62に含まれる配列又はcDNA中のヌクレオチドの5%までを欠失、挿入、又は他のヌクレオチドで置換することができる。これらの変更はそのポリヌクレオチドの何処でも起こり得る。 10

【0037】

本発明のさらなる実施態様は、SEQ ID NO: 1-62に含まれる配列に少なくとも80%の同一性、より望ましくは少なくとも90%の同一性、また処理望ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性をもつポリヌクレオチドを含む。勿論、遺伝子コードの縮退のゆえに、従来技術の普通の熟練度の人は少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を持つ数多くのポリヌクレオチドがSEQ ID NO: 1-62の翻訳に含まれるアミノ酸配列に同一のポリヌクレオチドを暗号化することを直ちに認めるであろう。 20

【0038】

同様に、基準ポリペプチドに少なくとも、例えば、95%の“同一性”を持つアミノ酸配列を持つポリペプチドにより、そのポリペプチドのアミノ酸配列が、ポリペプチド配列が基準ポリペプチド全長の各100アミノ酸当たり5アミノ酸の変質までを含む可能性のあることを除き、基準ポリペプチドに同一であることが意図されている。換言すれば、基準アミノ酸配列に少なくとも95%同一のアミノ酸配列をもつポリペプチドを得るには、基準配列中のアミノ酸残基の5%までを欠失又は他のアミノ酸で置換できるか、又は基準配列中の総アミノ酸残基の5%までの数のアミノ酸を基準配列中に挿入できる。基準配列のこれらの変質は基準アミノ酸配列のアミノ及びカルボキシル末端位置か、又は基準配列中の残基間に個別にあるいは基準配列内に一つ又はそれ以上の連続グループかのいずれかで点 30

【0039】

本発明のさらなる実施態様は、SEQ ID NO: 1-62の翻訳に含まれるアミノ酸配列に少なくとも80%同一、より望ましくは少なくとも85%同一、より望ましくは少なくとも90%同一及び最も望ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を持つポリペプチドを含む。望ましくは、上述のポリペプチドはタンパク質の少なくとも1生物学的活動度を示すべきである。

【0040】

望ましい実施態様では、本発明のポリペプチドはSEQ ID NO: 1-62の翻訳に含まれるアミノ酸配列に少なくとも90%の相似性、より望ましくは少なくとも95%の相似性、またさらにより望ましくは少なくとも96%、97%、98%、又は99%の相似性をもつポリペプチドを含む。 40

【0041】

変種はコード領域、ノンコーディング領域、又は両方に変質を含み得る。特に望ましいのは、サイレントな置換、付加、又は欠失を生成するが、暗号化されたポリペプチドの特性や活動度を変更しない変質を含んでいるポリヌクレオチド変種である。遺伝暗号の縮退のゆえにサイレントな置換により生成されたヌクレオチド変種が望ましい。その上、5-10、1-5又は1-2アミノ酸が任意の組合せで置換、欠失又は付加される変種もまた望ましい。ポリヌクレオチド変種は、例えば、特定の宿主のためにコドン発現を最適化する 50

ため（人間のmRNA内のコドンでE. coliなどの最近宿主に好まれるものに変更する）など、様々の理由で生成される可能性がある。

【0042】

自然発生の変種は“対立変種”と呼ばれ、また生体の染色体上の与えられた座を占拠する遺伝子のいくつかの代案の形の一つを言う。（遺伝子II、Lewin, B., ed., John Wiley & Sons、ニューヨーク（1985年））。これらの対立変種はポリヌクレオチド及び／又はポリペプチドのレベルのいずれでも変化し得る。代案として、非自然発生の変種は突然変異生成技術や直接合成により生成することができる。

【0043】

タンパク質工学と組換えDNAテクノロジーの既知の方法を使用して、本発明のポリペプチドの特性を改善又は変更するために変種を生成することができる。例えば、1個又はそれ以上のアミノ酸を生物学的機能の実質的な欠失なしに分泌されたタンパク質のN-末端やC-末端から欠失することができる。Ron等、生物化学ジャーナル268:2984-2988（1993年）の著者らは、3、8又は27アミノ末端アミノ酸残基の欠失後でさえ、ヘパリン結合活動度を有するKGF変種タンパク質を報告している。同様に、ガンマ・インターフェロンはこのタンパク質のカルボキシ末端から8-10アミノ酸残基を欠失後に10倍高い活動度までを示した（Dobeli等、生物工程学ジャーナル7:199-216（1988年））。 10

【0044】

その上、変種は自然発生タンパク質のそれと同様の生物学的活動度を保持することを示す多くの証拠が存在する。例えば、Gayleと共同研究者ら（生物化学ジャーナル268:22105-22111（1993年））は、人間のシトキンIL-1aの詳細な変異分析を行った。彼等はランダムな突然変異生成を使用して、分子の全長にわたって変種当たり平均2.5アミノ酸が変化する3,500個体以上のIL-1a突然変異体を生成した。可能なそれぞれのアミノ酸位置で複数の突然変異が検証された。研究者らは“[ほとんどの分子が[結合又は生物学的活動度]のいずれにもほとんど影響なく変更され得る”ことを発見した。（Gayle等、（1993年）、要約を参照）。事実、検証された3,500以上のヌクレオチド配列のうちユニークな23のアミノ酸配列のみが野生タイプからの活動度に有意的变化を起こすタンパク質を生成した。 20

【0045】

さらに、ポリペプチドのN-末端やC-末端から1個又はそれ以上のアミノ酸の欠失が、1個又はそれ以上の生物学的機能の修正や欠失を起こす結果となるにしても、他の生物学的活動度は依然として保持される。例えば、分泌された形を認知する抗体を誘導又は結合する欠失変種の能力は、分泌された形の残基の過半数未満がN-末端又はC-末端から取除かれるときは保持される可能性が高い。タンパク質のN-又はC-末端残基を欠失している特定ポリペプチドが斯かる免疫原性活動度を保持するかどうかは本発明で説明され、且つ別途従来技術で知られた通常の方法により容易に決定することができる。 30

【0046】

よって、発明はさらに実質的な生物学的活動度を示すポリペプチド変種を含む。斯かる変種には、活動度に対してほとんど影響がないとして従来技術で知られた一般的規則に従って選定された欠失、挿入、逆位、反復、及び置換が含まれる。例えば、形質的にサイレントなアミノ酸置換をどのように行うかの指針がBowle, J. U.等、科学247:1306-1310（1990年）に提供されており、そこで著者らはアミノ酸配列の寛容度の変化の研究について二つの主要な戦略が存在すると指摘する。 40

【0047】

最初の戦略は変化プロセス中の自然選択によるアミノ酸置換の寛容度を利用する。諸種に於けるアミノ酸配列の比較により、保存されるアミノ酸を識別することができる。これらの保存されたアミノ酸はタンパク質機能にとって重要な可能性が高い。逆に、自然選択で置換が許容されたアミノ酸位置はこれらの位置がタンパク質機能にとって決定的に重要ではないことを指摘する。よって、寛容なアミノ酸置換はタンパク質の生物学的活動度を依 50

然として維持しながら修飾され得ることになるう。

【0048】

第2の戦略はタンパク質機能の決定的に重要な領域を識別するのにクローン化された遺伝子の特定の位置にアミノ酸の変化を導入するため遺伝子工学を使用する。例えば、部位特異的突然変異誘発法やアラニン走査突然変異誘発法（分子の各残基に単一アラニン突然変異の導入）を使用できる。（CummingsとWells、科学244：1081-1085（1989年））。次いで、その結果生じる突然変異分子をその生物学的活動度についてテストできる。

【0049】

著者らが述べているように、これら二つの戦略でタンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることが判明した。著者らはさらに、アミノ酸の変化はタンパク質中の特定のアミノ酸位置で容認される可能性の高いことを指摘する。例えば、ほとんどの埋没された（タンパク質の三次構造内に）アミノ酸残基は無極側連鎖を必要とするのに、表面側連鎖の特徴は一般的に少ししか保存されない。その上、許容された保存性のアミノ酸置換は脂質又は疎水性アミノ酸Ala, Val, Leu及びIleの置換え；ヒドロキシル残基SerとThrの置換え；酸性残基AspとGluの置換え；アミド残基AsnとGlnの置換え；塩基性残基Lys, Arg, 及びHisの置換え；芳香性残基Phe, Tyr, 及びTrpの置換え及び小型アミノ酸Ala, Ser, Thr, Met, 及びGlyの置換えを含む。

【0050】

保存性アミノ酸置換のほかに、本発明の変種には以下が含まれる：(i) 非保存アミノ酸残基1個又はそれ以上との置換、この場合、置換されたアミノ酸残基は遺伝暗号でコード化されることもされないこともある、又は(ii) 置換基を持つアミノ酸残基の1個又はそれ以上との置換、又は(iii) ポリペプチドの安定性及び／又は溶解性を増加させる化合物（例：ポリエチレン・グリコール）他の化合物との成熟ポリペプチドの融合、又は(iv) IgG Fc融合領域ペプチド、又はリーダーや分泌配列、又は配列促進精製など、追加アミノ酸とのポリペプチドの融合。斯かる変種ポリペプチドは本発明の技術から従来技術に習熟した人達の範囲に入ると見なされる。

【0051】

例えば、荷電アミノ酸の他の荷電又は中性アミノ酸でのアミノ酸置換を含むポリペプチド変種は、より少ない凝集など改善された特徴を持つタンパク質を生成することができる。薬学的処方の凝集は活動度を低下させるとともに、凝集物の免疫原性活動度のゆえにクリアランスを増加する。（Pincard等、臨床実験免疫学2：331-340（1967年）；Robbin等、糖尿病36：838-845（1987年）；Cleland等、Crit. Rev. 治療薬輸送システム10：307-377（1993年））。

【0052】

ポリヌクレオチドとポリペプチドの断片

本発明に於いて、“ポリヌクレオチド断片”とはSEQ ID NO：1-62に示されたものに含まれる核酸配列を有する短いポリヌクレオチドを言う。短いヌクレオチド断片は望ましくは少なくとも約15 nt、またより望ましくは少なくとも約20 nt、さらに望ましくは少なくとも約30 nt、さらになお望ましくは少なくとも約40 ntの長さを持つ。例えば“少なくとも20 ntの長さ”の断片はSEQ ID NO：1-62に示されたものに含まれるcDNA配列から20又はそれ以上の隣接する塩基を含むことが意図される。これらのヌクレオチド断片は本発明で論じたように診断プローブとプライマーとして有益である。勿論、より大きい断片（例：50、150、及びそれ以上のヌクレオチド）が望ましい。

【0053】

その上、発明のポリヌクレオチド断片の代表的な例には、およそヌクレオチド番号1-50、51-100、101-150、151-200、201-250、251-300

10

20

30

40

50

、301-350、351-400、401-450からSEQ ID NO: 1-62の最後まで1配列を持つ断片が含まれる。この文脈に於いて“およそ”とは、いずれかの末端又は両端で、いくつかの(5、4、3、2又は1)ヌクレオチドでより大きくか又はより小さく、特別に列挙された範囲を含む。望ましくは、これらの断片は生物学的活動度を持つポリペプチドをコード化する。

【0054】

本発明に於いて、“ポリペプチド断片”とはSEQ ID NO: 1-62の翻訳に含まれる短いアミノ酸配列を言う。たんぱく質断片は“自律(free-standing)”であるか又はその断片が一部又は領域を形成するより大きいポリペプチド内に、より望ましくは単一隣接領域として含まれることができる。発明の代表的なポリペプチド断片の例には、例えば、およそアミノ酸番号1-20、21-40、41-60、又は61からコーディング領域の最後まで断片が含まれる。その上、ポリペプチド断片はおよそ20、30、40、50又は60のアミノ酸長さであり得る。この場合“およそ”は、いずれかの末端又は両端でいくつかの(5、4、3、2又は1)アミノ酸でより大きくか又はより小さい特に列挙された範囲を含む。

10

【0055】

望ましいポリペプチド断片には分泌されたタンパク質並びにその成熟形が含まれる。さらに望ましいポリペプチド断片にはアミノ又はカルボキシ末端、あるいは両方からの欠失残基の連続シリーズを有する分泌されたたんぱく質又はその成熟形が含まれる。例えば、1-60の範囲の任意の数のアミノ酸は分泌されたポリペプチドか又はその成熟形のいずれかのアミノ末端から欠失される可能性がある。同様に、1-30の範囲の任意の数のアミノ酸は分泌されたたんぱく質かまたは成熟形のカルボキシ末端から欠失される可能性がある。さらには、上記のアミノ及びカルボキシ末端欠失の任意の組合せが望ましい。同様に、これらのポリペプチド断片をコード化するポリヌクレオチド断片も望ましい。

20

【0056】

また望ましいのは、 α ヘリックスと α ヘリックス形成領域、 β シートと β シート形成領域、turnとturn形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 α 両親媒性領域、 β 両親媒性領域、可とう性領域、表面形成領域、基質結合領域、及び高抗原指数領域を含んでいる断片など、構造的または機能的ドメインにより特徴付けられるポリペプチドとポリヌクレオチドの断片である。保存されるドメイン内に入るSEQ ID NO: 1-62の翻訳のポリペプチド断片は本発明により特に意図される。その上、これらのドメインをコード化するポリヌクレオチド断片もまた意図される。

30

【0057】

その他の望ましい断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は本発明のポリペプチドの活動度に同一ではなくとも相似の活動度を示すものである。これらの断片の生物学的活動度は改善された望ましい活動度や減少した望ましくない活動度を含むことができる。

【0058】

エピトープと抗体

本発明に於いて“エピトープ”とは、動物で、特に人間に於いて抗原性や免疫原性活動度を有するポリペプチド断片を言う。本発明の望ましい実施態様は、エピトープならびにこの断片をコード化するポリペプチドを含んでいるポリペプチド断片に関係する。抗体が結合できるタンパク質分子の領域は“抗原性エピトープ”と定義される。これに対して、“免疫原性エピトープ”は抗体反応を引出すタンパク質の一部と定義される。(例えば、Geysen等、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国81: 3998-4002 (1983)を参照)。

40

【0059】

エピトープとして機能する断片は従来手段のいずれによっても生成することができる。(例として、Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. 米国82: 5131-5135 (1985年)及び米国特許No. 4,63

50

1, 211の説明を参照)。

【0060】

本発明では、抗原性エピトープは望ましくは少なくとも7個、より望ましくは少なくとも9個、またさらにより望ましくは約15から約30個のアミノ酸の配列を含む。抗原性エピトープは、エピトープを特異的に結合するモノクローナル抗体を含め、抗体をつくるのに有益である。(例として、Wilson等、細胞 37:767-778 (1984年); Sutcliffe, J. G. 等、科学 219:660-666 (1983年)を参照)。

【0061】

同様に、免疫原性エピトープは従来技術で良く知られた方法に従って抗体を誘発するのに使用することができる。(例として、Sutcliffe等、前記; Wilson等、前記; Chow, M. 等、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国82:910-914; 及びBittle, F. J. 等、遺伝ウイルス学ジャーナル66:2347-2354 (1985年)を参照)。望ましい免疫原性エピトープには分泌されたタンパク質が含まれる。免疫原性エピトープは動物系(ウサギやマウスなど)に対してアルブミンなどの輸送タンパク質と一緒に、あるいは十分な長さを持つ場合は単体なしで、提出することができる。しかしながら、免疫原性エピトープは8~10など少ないアミノ酸しか含まない免疫原性エピトープが、最低でも、変質したポリペプチド(例:ウェスタン・ブロット法)内の線形エピトープに結合可能な抗体を作るのに充分であることが示されている。

【0062】

本発明で使用する時、“抗体”(Ab)又は“モノクローナル抗体”(Mab)の語句はタンパク質に特異的に結合可能な完全な分子ならびに抗体断片(例えば、FabとF(ab')₂断片など)を含むことを意味する。FabとF(ab')₂断片は完全な抗体のFc断片を欠いており、循環からより速く消滅し、完全な抗体より非特異的組織結合が少ない可能性がある。(Wahl等、核医学24:316-325 (1983年))。よって、これらの断片はFABやその他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物とともに望ましい。その上、本発明の抗体はキメラ、単鎖及び人化抗体を含む。

【0063】

追加の実施態様は、例えば、ネズミ科モノクローナル抗体の人化バージョンなど、キメラ抗体を含む。斯かる人化抗体は既知の技術により調整でき、また抗体を人間に投与する場合に免疫原性が少ないという利点を有する。一つの実施態様では、人化モノクローナル抗体はネズミ抗体の変動領域(又は単にその抗体結合部位)と人間抗体から誘導された恒常領域とを含んでいる。代案として、人化抗体断片はネズミのモノクローナル抗体の抗体結合部位と人間抗体から誘導された変動領域断片(抗体結合部位を欠如)とを含むことができる。キメラ抗体とさらには工学的モノクローナル抗体の生産手続きにはRiechmann等により記述されたものが含まれる(自然 332:323、1988年)、Liu等(PNAS 84:3439、1987年)、Larrick等(生物/工学 7:934、1989年)、及びWinterとHarris(TIPS 14:139、1993年5月)。

【0064】

抗体を生成する一つの方法はSEQ ID NO:1-62から選択されたヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドで、形質転換したマウスなど、人間以外の動物の免疫化を含み、この場合、SEQ ID NO:1-62から選択されたヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドに対して向けられる抗体が当該の動物に生成される。この手続きは人間以外の動物に人間抗体を生成するために開発された。抗体は部分的に人間のもの、あるいは望ましくは完全に人間のものである。一つ又はそれ以上の人間の免疫グロブリン鎖をコード化する遺伝物質を導入した人間以外の動物(形質転換したマウス達など)を採用できる。斯かる形質転換したマウス達は様々の方法で遺伝学的に変質させることができる。遺伝子操作は免疫化時に動物により生成された少なくとも数個(望ましくは全部)の

抗体内で内在的免疫グロブリン鎖を置換える人間の免疫グロブリン・ポリペプチド鎖を結果として生じることができる。SEQ ID NO: 1-62から選択されたヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドで免疫化する形質転換された動物により生成される抗体が本発明で提供される。

【0065】

一つ又はそれ以上の内在的免疫グロブリン遺伝子が種々の手段で不活性化されるマウス達が準備された。人間の免疫グロブリン遺伝子が不活性化されたマウス遺伝子を置換えるためにマウス達に導入された。動物内に生成される抗体は動物内に導入された人間の遺伝物質によりコード化された人間の免疫グロブリン・ポリペプチド鎖を組込む。斯かる形質転換動物の生成と使用に関する技術の例は米国特許5,814,318、5,569,825及び5,545,806に説明されており、これらは参考として本発明に組込まれている。 10

【0066】

モノクローナル抗体は従来の手続き、例えば、免疫化スケジュール完了後の形質転換した動物から採取した不死化脾臓細胞により生成できる。脾臓細胞は、従来の手続きにより、融合細胞腫を生成するために骨髓腫細胞と融合することができる。

【0067】

ハイブリドーマ細胞系を生成する方法は以下を含む：SEQ ID NO: 1-62から選択したヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドの少なくとも7個の隣接アミノ酸残基を含んでいる免疫原でもって形質転換した動物を免疫化すること；免疫化した動物から脾臓細胞を採取すること；採取した脾臓細胞を骨髓腫細胞系に融合し、それによってハイブリドーマ細胞を生成すること；及びSEQ ID NO: 1-62から選択したヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドを結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞系を識別すること。斯かるハイブリドーマ細胞系、及びそれらから生成されたモノクローナル抗体は本発明に含まれる。ハイブリドーマ細胞系により分泌されるモノクローナル抗体は従来技術により精製される。 20

【0068】

抗体は生体外手続きで採用するか、又はSEQ ID NO: 1-62から選択したヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドにより誘発される生物学的活動度を抑制するため生体内で投与することができる。このようにして、細胞表面受容体と本発明の斯かるポリペプチドとの相互作用により引起されるか又は激化された（直接又は間接的に）疾患を処置することができる。一つの治療方法にはSEQ ID NO: 1-62から選択したヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドにより誘発される生物学的活動度を低減するのに有効量での哺乳動物への遮断抗体の生体内投与が含まれる。 30

【0069】

また、SEQ ID NO: 1-62から選択したヌクレオチド配列から翻訳されたポリペプチドに対して向けられる抗体に結合される検出可能な（例：診断）治療因子を含んでいる結合体も本発明に含まれる。斯かる因子の例は良く知られており、診断放射性核種、治療放射性核種、及び細胞毒薬を含むがこれに制限されない。結合体は生体外又は生体内の手続きで使用できる。 40

【0070】

融合タンパク質

本発明の任意のポリペプチドが融合タンパク質を生成するのに使用できる。例えば、本発明のポリペプチドは、第2タンパク質に融合されるとき、抗原タグとして使用することができる。本発明のポリペプチドに対して作られる抗体はそのポリペプチドに結合することによって第2タンパク質を間接的に検出するのに使用できる。その上、分泌されたタンパク質は交流信号（*trafficking signals*）に基づいて細胞位置を標的とするので、本発明のポリペプチドは他のタンパク質に一旦融合すると標的分子として試用することができる。

【0071】

本発明のポリペプチドに融合できるドメインの例には、異種信号配列のみならず、異種機能領域も含まれる。融合は必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を通じても起こり得る。

【0072】

その上、融合タンパク質は本発明のポリペプチドの性質を改善するためにも加工できる。例えば、追加アミノ酸の領域、特に荷電したアミノ酸はをポリペプチドのN-末端に追加して、宿主細胞からの精製中の又はその後の取扱いや保存中の安定性と耐性を改善できる。また、ペプチド成分をポリペプチドに追加して精製を促進することもできる。斯かる領域はポリペプチドの最終調整の前に除去することが可能である。ポリペプチドの取扱いを容易にするためのペプチド成分の追加は従来技術では良く知られた日常的な技術である。

10

【0073】

その上、断片を含め本発明のポリペプチド、特にエピトープは免疫グロブリン (IgG) の恒常ドメイン部分と組合せることができ、結果としてキメラ・ポリペプチドを生じる。これらの融合タンパク質は精製を促進しまた生体内での半減期の増加を示す。一つの報告例では、人間のCD4-ポリペプチドの最初の2ドメインと哺乳類の免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の恒常領域の種々のドメインとを説明している。(EP A 394, 827; Trauneker等、自然331:84-86(1988年))。ジスルフィド結合の二量体構造(IgGによる)を有する融合タンパク質もまた、単量体の分泌タンパク質やタンパク質断片のみよりも、他の分子の結合及び中性化に於いてより効果的である。(Fountoulakis等、生化学ジャーナル270:3958-3964(1994年))。

20

【0074】

同様に、EP-A-0 464 533(カナダの対応物2045869)は他の人間タンパク質やその部分と一緒に免疫グロブリンの恒常領域の諸部分を含んでいる融合タンパク質を開示している。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は治療と診断に有益であり、よってまた、例えば、改善された薬物動態特性を与える。(EP-A 0 232 262)。別案として、融合タンパク質が発現、検出、及び精製されたあとでのFc部分の欠失が望ましいと思われる。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用されると、Fc部分は治療及び診断を遅らせる可能性がある。例えば薬の発見に於いて、hIL-5などの人間タンパク質はhIL-5の拮抗薬を識別するため高い処理能力のスクリーニング検定目的でFc部分と融合された。(D. Bennett等、分子認知法8:52-58(1995年); K. Johanson等、270:9459-9471(1995年)を参照)。

30

【0075】

その上、本発明のポリペプチドは、融合されたポリペプチドの精製を促進するペプチドなど、マーカー配列に融合することができる。望ましい実施態様では、マーカー・アミノ酸配列は、例えばpQEベクター(QLAGEN社、91311カリフォルニア州チャッツワース、エトン・アベニュー9259番地)中に提供されるタグなど、その多くが市販で入手可能なヘキサ・ヒスチジン・ペプチドである。例えば、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質の便利な生成方法を提供している(グランツ等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989年))。精製用に有益な他のペプチド・タグ、“HA”タグはインフルエンザ血球凝集素タンパク質から誘導されたエピトープに相当する。(Wilson等、細胞37:767(1984年))。このように、上記の融合のいずれも本発明のポリヌクレオチドやポリペプチドを使用して加工することができる。

40

【0076】

ベクター、宿主細胞及びタンパク質の生成

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、及び組換え技術によるポリペプチドの生成にも関係する。ベクターは、例えば、相、プラスミド、ウィルス性、又はレトロウィルス・ベクターであり得る。レトロウィルス・ベクターは複製可能又

50

は複製不能であり得る。後者の場合、ウィルス伝播は一般的に相補宿主細胞内で起こるであろう。

【0077】

ポリヌクレオチドは宿主内で伝播するため選択可能なマーカールを含んでいるベクターに結合され得る。一般的に、プラスミド・ベクターは燐酸カルシウム沈殿などの沈殿物中に、あるいは荷電した脂質との複合体中に導入される。ベクターがウィルスである場合、適当なパッケージ細胞系を使用して生体外でパッケージしてから宿主細胞内に形質導入することができる。

【0078】

ポリヌクレオチド挿入は、λ相PL促進因子、E. coli ラクトース (lac)、trp、pホA及びtac促進因子、SV40早期及び後期促進因子及びレトロウィルスLTRsの促進因子など多数のうち適切な促進因子に有効に結合するべきである。他の適切な促進因子は熟練した技術者には知られている。発現構造はさらに遷移開始、終了のための部位、及び転写された領域に、翻訳用のリボソーム結合部位を含む。構造により発現される転写のコーディング部分は望ましくは翻訳されるポリペプチドの最初に翻訳開始コドンと及び最後に適切に位置付けられた終了コドン(UAA、UGA又はUAG)を含む。

【0079】

指摘されているように、発現ベクターは望ましくは少なくとも1個の選択可能マーカールを含む。斯かるマーカールは真核細胞培養のためのジヒドロホレート還元酵素、G418又はネオマイシン抵抗、及びE. coliとその他のバクテリアで培養するためのテトラサイクリン、カナマイシン又はアンピリシン抵抗遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例には、E. coli、ストレプトマイセス及びサルモネラ・ネズミチフス菌細胞などのバクテリア細胞；酵母細胞などの真菌細胞；ドロソフィラS2とSpodoptera Sf9細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、293、Boweの黒色腫細胞などの動物細胞及び植物細胞が含まれるが、これに制限されない。上述の宿主細胞に関する適切な培地と条件は従来技術で知られている。

【0080】

バクテリアで使用するのに望ましいベクターの中には、QLAGEN社から入手可能なpQE70、pQE60及びpQE-9；Stratagene Cloning Systems社から入手可能なpBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A；及びPharmacia Biotech社から入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5が含まれる。望ましい真核ベクターの中には、Stratagene社から入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXTI及びpSG；及びPharmacia社から入手可能なpSVK3、pBPV、pMSG及びpSVLがある。その他の適切なベクターは熟練した技術者には容易に分かる。宿主細胞への構造の導入は、燐酸カルシウム移入、DEAE-デキストラン仲介移入、陽イオン脂質仲介移入、電気穿孔法、形質導入、感染、またはその他の方法で実施できる。斯かる方法は、Davis等、分子生物学の基本的な方法(1986年)などの多くの標準的な実験マニュアルで説明されている。本発明のポリペプチドは事実上組換えベクターを欠如した宿主細胞により発現されることが特異的に意図される。

【0081】

本発明のポリペプチドは、硫酸アンモニウムやエタノール沈殿、酸抽出、陽イオン又は陰イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロース・クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィー及び植物凝集素クロマトグラフィーを含む既知の組換え細胞培養から回収及び精製することができる。最も望ましくは、高性能液体クロマトグラフィー(“HPLC”)が精製用に使用される。

【0082】

本発明のポリペプチド、及び望ましくはその分泌された形もまた以下から回収できる：直

接分離されたか又は培養された身体の流体、組織及び細胞を含む自然発生源から精製された産物；合成方法；及び例えば、バクテリア、酵母、高木、昆虫、及び哺乳類の細胞を含めた原核又は真核宿主から組換え技術により生成された産物。組換え生成方法で採用された宿主によって、本発明のポリペプチドはグリコシル化されるか又はグリコシル化されない。加えて、本発明のポリペプチドは、場合によっては宿主仲介プロセスの結果として、初期メチオニン残基を含むこともあり得る。このように、翻訳開始コドンによりコード化されたN-末端メチオニンが一般的に、すべての真核細胞内の翻訳後に如何なるタンパク質からも高効率で除去されることは良く知られている。ほとんどのタンパク質上のN-末端メチオニンもまたほとんどの原核生物で効率的に除去されるのに対して、いくつかのタンパク質では、N-末端メチオニンが共有的に結合されるアミノ酸の性質によって、この原核除去プロセスが不十分である。 10

【0083】

ポリヌクレオチドの使用法

本発明で識別されるポリヌクレオチドのそれぞれは試薬として数多くの用途に使用できる。以下の説明は代表的なものであり且つ基地の技術を使用している。

本発明のポリヌクレオチドは染色体の識別に有益である。実際の配列データ（反復多形性）に基づく染色体マーキング試薬が現在少ししか入手できないことから、新しい染色体マーカーを識別する必要性が現存する。本発明の各ポリヌクレオチドは染色体マーカーとして使用可能である。

【0084】

簡単に説明すると、配列はSEQ ID NO: 1-62に示された配列からPCRプライマー（望ましくは15-25 bp）を調整することにより作図できる。プライマーはゲノムDNA内の予想される1エクソン以上に広がらないように、コンピュータ分析を使用して選択される。次いでこれらのプライマーは個々の人間染色体を含んでいる身体細胞の雑種のPCRスクリーニングのために使用される。SEQ ID NO: 1-62に相当する人間の遺伝子を含んでいる雑種のみが増幅された断片を発生する。 20

【0085】

同様に、身体の雑種はポリヌクレオチドを特定の染色体にPCR作図する迅速な方法を提供する。単一の熱循環装置（cycler）を使用して、1日当たり3個又はそれ以上のクローンを割当てることができる。その上、ポリヌクレオチドのsublocalizationは特異的染色体断片パネルで行うことができる。使用可能な他の遺伝子作図戦略には、自然位での雑種形成、標識付きフロー選別（flow-sorted）染色体でのプレスクリーニング、及び染色体特異的-cDNAライブラリーを構成するための雑種形性による事前選択が含まれる。 30

【0086】

ポリヌクレオチドの正確な染色体の位置付けもまた、中期染色体波及の蛍光自然位雑種形成（FISH）を使用して行うことができる。この技術は500又は600塩基と短いポリヌクレオチドを使うが、但し、2,000~4,000bpのポリヌクレオチドが望ましい。この技術を確認するには、Verma等、“人間の染色体：基本的技術マニュアル” Pergamon出版、ニューヨーク（1988年）を参照。 40

【0087】

染色体の地図作製では、ポリヌクレオチドは個別に（単一染色体又はその染色体上の単一部位をマークするため）又はパネルで（複数の部位及び／又は複数の染色体をマークするため）を使用することができる。望ましいポリヌクレオチドは、コーディング配列が遺伝子族内でより保存されやすく、よって染色体地図作製中の雑種交配のチャンスを増加させることから、cDNAのノンコーディング領域に相当する。

【0088】

ポリヌクレオチドが正確な染色体位置に作図されると、そのポリヌクレオチドの物理的位置を結合分析でを使用することができる。結合分析は染色体の位置と特定疾患の提示との間の共同遺伝（coinheritance）を確立する。（疾患地図作製データは、例え 50

ば、V. McKusick、人間に於けるメンデル遺伝（ジョン・ホプキンス大学ウェルチ医学図書館を通じてオンラインで入手可能）にある）。1メガベースの地図作製解像度と20 kb当り1遺伝子を仮定すると、疾患と結び付いた染色体領域に正確に位置付けられるcDNAは50-500の潜在的原因遺伝子のうちの一つであり得る。

【0089】

よって、共有遺伝が確立されると、病気の個体と病気でない個体の間のポリヌクレオチドと相当遺伝子の差を検査することができる。SEQ ID NO: 1-62のポリヌクレオチドは個々の人間のこの分析用に使用できる。

【0090】

まず、欠失や転座などの染色体の視覚的構造変化を染色体波及内に又はPCRにより検査することができる。構造変化が起こっていないければ、ポイント突然変異の存在を確認する。正常な個体以外の病気の個体の幾つか又は全部に観察された突然変異は疾患を引き起こす可能性がある。しかしながら、多形現象から突然変異を区別するには、幾人かの正常な個体からのポリペプチドと相当する遺伝子の完全な配列決定が必要になる。新しい多形現象が識別されると、この多形ポリペプチドをその後の結合分析に利用できる。

【0091】

さらに、病気でない個体と比較して病気の個体内の遺伝子発現の増加又は減少は、本発明のポリヌクレオチドを使用して評価することができる。これらの変化（発現の変化、染色体の配列替え、又は突然変異）はいずれも診断や予断マーカーとして使うことができる。

【0092】

上述に加えて、ポリヌクレオチドは3重螺旋形成又はアンチセンスDNAやRNAを通じて対照遺伝子発現に使用できる。両方法ともDNAやRNAへのポリヌクレオチドの結合に依拠する。これらの技術に関して、望ましいポリヌクレオチドは、通常、20から40塩基の長さであり、また転写に関与する遺伝子の領域か（3重螺旋 - Lee等、核酸研究6:3073（1979年）；Cooney等、科学241:456（1988年）；及びDervan等、科学251:1360（1991年）を参照）又はmRNA自体（アンチセンス - Okano、核化学ジャーナル56:560（1991年）；遺伝子発現のアンチセンス抑制剤としてのOligodeoxynucleotide、CRC出版、BicaRaton、フロリダ（1988年））のいずれかに相補的である。3重螺旋形成は最適には結果としてDNAからのRNA転写の停止（shutoff）を起こすのに対して、アンチセンスRNA雑種形成はmRNA分子のポリペプチドへの翻訳を遮断する。両方の技術ともモデル・システムで有効であり、また本発明で開示される情報は疾患の処置の努力に於いてアンチセンスや3重螺旋ポリヌクレオチドを設計するのに使用できる。

【0093】

本発明のポリヌクレオチドはまた遺伝子治療でも有益である。遺伝子治療の一つの目的は遺伝的欠損症を正す努力に於いて、正常な遺伝子を欠陥遺伝子を持つ器官に挿入することである。本発明で開示するポリヌクレオチドは非常に精密に斯かる遺伝的欠損症を標的にする手段を提供する。もう一つの目的は宿主ゲノムに存在しない新しい遺伝子を挿入して、宿主細胞に新しい特徴を生成することである。

【0094】

ポリヌクレオチドはまた、微小な生物学的試料から個体を識別するのに有益である。例えば、米国軍隊はその人員の識別に制限断片長多型（RFLP）の使用を考慮している。この技術では、個人のゲノムDNAが1個又はそれ以上の制限酵素とともに消化され、それからサザン・ブロット上で精査されて人の識別のため唯一のバンドを発生する。この方法は紛失、変更又は盗難の可能性があって肯定的識別を困難にしている“鑑札”の現在の制限を受けない。本発明のポリヌクレオチドはRFLP用の追加のDNAマーカーとして使用できる。

【0095】

本発明のポリヌクレオチドはまた、個人のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのD

10

20

30

40

50

NA配列を決定することにより、RFLPの代案としても使用できる。これらの配列は、そのあとで配列決定される、斯かる選択されたDNAを増幅及び分離するためのPCRプライマーを調整するのに使用できる。この技術を使用して、各個人は唯一のDNA配列集合を持つことから、個人を識別することができる。唯一のIDデータベースがある人について確立されれば、生存中でも死亡後でも、その人の肯定的識別が非常に小さい組織試料から行えるようになる。

【0096】

法廷生物学もまた本発明で開示するDNAベースの識別技術の使用の恩恵を受ける。毛髪や皮膚などの組織、あるいは血液、唾液、精液などの体液など、非常に小さい生物学的試料から取られたDNA配列はPCRを使用して増幅することができる。一つの先駆的技術では、DQaクラスII HLA遺伝子など、多形性遺伝子座から増幅された遺伝子配列が個人を識別するために法廷生物学で使用されている。(Erlisch, H., PCRテクノロジー、Freeman社(1990年))。これらの特異的な多形性遺伝子座が増幅されると、1個又はそれ以上の制限酵素とともに消化され、DQaクラスII HLA遺伝子に相当するDNAで精査されたサザン・ブロット上に識別バンド集合を発生する。同様に、本発明のポリヌクレオチドは法廷目的での多形性マーカーとして使用できる。

10

【0097】

特定の組織の発生源を識別できる試薬についても必要性が存在する。斯かる必要性は、例えば、未知の起源の組織を提示されたときの法廷で発生する。適切な試薬には、例えば、本発明の配列から調整された特定の組織に特異的なDNAプローブやプライマーを含むことができる。斯かる試薬パネルは種により及び／又は器官タイプにより組織を識別できる。同様に、これらの試薬は汚染に関して組織培養をスクリーニングするのに使用できる。

20

【0098】

最小限、本発明のポリヌクレオチドは、サザン・ゲル上の分子量マーカーとして、特定の細胞タイプの特異的mRNAの存在に関する診断プローブとして、新規のポリヌクレオチド発見プロセス中に既知の配列を“引出す”ためのプローブとして、“遺伝子細片”やその他の支持体に付加するためのオリゴマーの選択又は作成のため、DNA免疫化技術を使用してアンチDNA抗体を作るため、及び免疫応答を引出すための抗原として使用できる。

【0099】

ポリペプチドの使用

ここで識別される各ポリペプチドは、様々な方法で使用し得る。以下の説明は、例証として考慮されるべきであり、既知の技法を利用するものである。

30

【0100】

本発明におけるポリペプチドは、抗体をベースとする技法を用いる、生物学的サンプルにおける蛋白質レベルのアッセイにおいて使用し得る。例えば、組織内における蛋白質の発現については、古典的な免疫組織学的方法により研究を行い得る(M・ジャルカネン他、J・セル・バイオロジー誌101号、976~985頁(1985年)、M・ジャルカネン他、J・セル・バイオロジー誌105号、3087~3096頁(1987年))。蛋白質遺伝子の発現を検出するうえで有益なその他の抗体をベースとする方法には、酵素免疫測定法(ELISA)や放射性免疫測定法(RIA)などの免疫測定法が含まれる。適切な抗体測定標識は、本分野において既知であり、ブドウ糖酸化物などの酵素標識や、ヨウ素(^{125}I 、 ^{125}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{112}In)およびテクニチウム($^{99\text{m}}\text{Tc}$)などの放射性同位元素、ならびにフルオレセインやローダミンなどの蛍光標識、およびビオチンが含まれる。

40

生物学的サンプルにおける分泌蛋白質レベルのアッセイに加えて、蛋白質は、また、造影によりインビボにおいて検出され得る。蛋白質のインビボ造影用抗体標識またはマーカには、X線撮影法、NMRまたはESRにより検出可能な標識またはマーカが含まれる。X線撮影法の場合、妥当な標識には、検出可能な放射線を放射するが、被験者にとって明白に有害ではないバリウムやセシウムなどの放射性同位元素が含まれる。NMRおよびES

50

Rにおいて適切なマーカには、関連するハイブリドーマを得るために、栄養素の標識付けを行うことで抗体内に組み込み得る、ジューテリウムなどの検出可能な特性スピンを有するものが含まれる。

【0101】

妥当な検出可能な造影部を用いて標識付けが行われている蛋白質特定抗体または蛋白質特定抗体断片、例えば、放射性同位元素（例えば ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）陽性造影基質、または核磁気共鳴により検出可能な材料を、哺乳動物に導入する（例えば、部分的に、被かに、あるいは腹膜内に）。本技術分野において、被験者の大きさならびに使用される造影システムが、診断画像を作り出すために必要な造影部の量を決定することになることが理解されるであろう。ヒトが被験者の場合で、放射性同位元素部の場合、注入される放射能の量は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ であれば、約5～20ミリキュリーとなる。標識付けが行われている抗体または抗体断片は、その後、選択的に、特定蛋白質を含む細胞の位置において蓄積されることになる。インビボ腫瘍造影については、S・W・バーカイル他「放射性同位元素を使って標識付けされる抗体およびその断片の免疫薬物動力学」（『腫瘍造影：癌の放射化学検出』第13章、S・W・バーカイル、B・A・ロズ編集、メイソン出版会社（1982年））において述べられる。

10

【0102】

このため、本発明によりは、（a）個人の細胞または体液内に発現する本発明によるポリペプチドのアッセイと、（b）遺伝子発現レベルと標準的遺伝子発現レベルとの比較が含まれる、障害診断法が提供されるが、すなわちアッセイされるポリペプチド遺伝子発現レベルと標準的発現レベルとの比較における増減により、障害が示されることになる。

20

【0103】

さらに、本発明におけるポリペプチドは、病気の治療においても使用し得る。例えば、ポリペプチドの欠落または減少レベルに取って代わるために（例えばインスリン）、異なるポリペプチドの欠落または減少レベルを補給するために（例えばヘモグロビンBに対しヘモグロビンS）、ポリペプチドの活動を抑制するために（例えば腫瘍形成遺伝子）、ポリペプチドの活動を活性化させるために（例えばレセプタに結合させることにより）、遊離配位子を得るために膜結合レセプタと競争させることによりその活動を軽減するために（例えば炎症を軽減する際に使用される可溶性のTNFレセプタ）、または望ましい応答を得るために（例えば血管の成長）、患者に、本発明におけるポリペプチドを投与し得る。

30

【0104】

同様に、本発明におけるポリペプチドに振り向けられる抗体についても、病気の治療において使用し得る。例えば、本発明におけるポリペプチドに振り向けられる抗体を投与することにより、その抗体はポリペプチドに結合し、ポリペプチドの過剰生成が軽減される。同様に、抗体を投与することにより、膜（レセプタ）に結合されているポリペプチドに結合させるなどの方法において、ポリペプチドを活性化し得る。

【0105】

少なくとも、絶対的に、本発明におけるポリペプチドは、当業者にとっては良く知られる方法を用いる、SDS-PAGEゲルまたは分子ふるいゲル透過カラムにおける分子量マーカとして使用し得る。ポリペプチドは、また、次に、宿主細胞の形質転換をアッセイする方法として、組換え細胞における蛋白質の発現を測定するために使用される抗体を作り出す際に使用し得る。さらに、本発明におけるポリペプチドは、以下の生物学的活動について試験を行う際にも使用し得る。

40

【0106】

生物学的活動

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、一つ以上の生物学的活動を試験するためのアッセイにおいて使用し得る。これらのポリヌクレオチドまたはポリペプチドがあるアッセイにおける活動を抑圧する場合、これらの分子は、その生物学的活動を付随する病気に関連し得ると考えられる。このため、そのポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、付随する病気の治療において使用し得る。

50

【0107】

免疫活動

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、免疫細胞の増殖、分化または移動（走化）を活性化あるいは抑制することにより、免疫システムの欠損または障害の治療において有益となり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれる工程を介して展開され、骨髄（血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ）やリンパ（BおよびTリンパ球）細胞を多能性幹細胞から生成する。これらの免疫欠損または免疫障害の原因については、癌や、何らかの（例えば化学療法や毒素により）取得される自己免疫障害あるいは感染などの、肉體における発生学的な原因であり得る。さらに、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、特定の免疫システムの病気または障害のマーカもしくは検出子として使用し得る。 10

【0108】

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、造血細胞の欠損あるいは障害の治療または検出において有益となり得る。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、ある種（あるいは多種）の造血細胞の減少を伴うこれらの障害を治療する際に、多能性幹細胞を含む造血細胞の分化および増殖を促進するために使用し得る。免疫学的欠損症候群の例として、血液蛋白質障害（例えば無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症）や、毛細管拡張性運動失調、一般的な可変免疫不全、ディジョージ症候群、HIV感染、HTLV-BLT感染、白血球付着不全症候群、リンパ球減少症、食細胞殺菌機能不全、重症複合免疫不全症（SCID）、ウィスコット-アルドリッチ症候群、貧血症、血小板減少症またはヘモグロビン尿症が含まれるが、これらに限られるものではない。 20

【0109】

さらに、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、止血（出血を止める）作用や血栓溶解作用（血塊形成）を柔ら月ために使用し得る。例えば、止血あるいは血栓溶解作用を増強することにより、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用して、血液凝固障害（例えば無線維素原血症、因子欠損症）、血小板障害（例えば血小板減少症）または外傷や手術またはその他の原因により発生した傷を治療し得る。あるいは、止血または血栓溶解作用を軽減し得る、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、凝固の抑制または溶解において使用し得る。これらの分子は、心臓発作（梗塞）、脳卒中または癰痕の治療において重要となり得る。 30

【0110】

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、また、自己免疫障害の治療または検出において有益となり得る。多くの自己免疫障害は、免疫細胞による自己の異物としての不適切な認識によりもたらされ、この不適切な認識により、宿主組織の破壊につながる免疫応答が発生する。このため、免疫応答、特にT細胞の増殖、分化または走化を抑制する、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与することは、自己免疫傷害を防止するうえで有効な治療法となり得る。

【0111】

本発明により治療または検出し得る自己免疫障害の例とし、アジソン病、溶血性貧血、抗リン脂質抗体症候群、慢性関節リウマチ、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、バセドウ病、多発硬化症、重症筋無力症、神経炎、眼炎、水泡性類疱瘡、天疱瘡、多発性内分泌障害、紫斑病、ライター病、スティフマン症候群、自己免疫甲状腺炎、全身性紅斑性狼瘡、自己免疫肺炎、ギラン-バレー症候群、インスリン依存糖尿病、頬炎および自己免疫炎症性眼病が含まれるが、これらに限られるものではない。 40

【0112】

同様に、喘息（特にアレルギー性喘息）またはその他の呼吸不全などのアレルギー反応やアレルギー状態も、また、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにより治療し得る。さらに、これらの分子は、抗原性分子あるいは血液型の不一致に対するアナフ 50

ィラキシーまたは過敏症の治療において使用し得る。

【0113】

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、また、臓器の拒絶または移植片—被移植体病（GVHD）の治療および／または防止においても使用し得る。臓器の拒絶は、移植された組織の被移植体免疫細胞が免疫応答により破壊されることにより発生する。同様に、免疫応答も、また、GVHDにおいて関連するが、この場合、異物移植免疫細胞は、被移植体組織を破壊する。免疫応答、特にT細胞の増殖、分化または走化を抑制する、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与することは、GVHDにおける臓器拒絶を防止する際に有効な治療法となり得る。

【0114】

同様に、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、炎症の緩和において使用し得る。例えば、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、炎症応答にかかわる細胞の増殖および分化を抑制し得る。これらの分子は、感染症を伴う炎症（例えば敗血症によるショック、セプシスまたは全身性の炎症応答症候群（SIRS））を含む、慢性および急性の両方の炎症状態の治療や、虚血再灌流障害、内毒素致死症、関節炎、超急性補体媒介拒絶、腎炎、細胞分裂または化学運動誘発肺創傷、炎症性腸病、クローン病、あるいは分裂細胞（例えばTNFまたはIL-1）が過剰に生成されるために発生する症状の治療において使用し得る。

【0115】

過剰増殖障害

ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、腫瘍を含み、過剰増殖障害の治療あるいは検出において使用し得る。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、障害の増殖を、直接的または間接的な相互作用を介して抑制し得る。あるいは、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、過剰増殖障害を抑制し得る別の細胞を増殖し得る。

【0116】

例えば、免疫応答、特に過剰増殖障害の抗原質を高めることにより、またはT細胞を増殖、分化あるいは移動することにより、過剰増殖障害は治療し得る。この免疫応答は、存在する免疫応答を高めるか、あるいは新しい免疫応答を作り出すかのいずれかの方法により強化し得る。もしくは、免疫応答を軽減する方法も、また、化学療法薬などの、過剰増殖

【0117】

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドにより治療または検出し得る過剰増殖障害の例として、腹部、骨、胸部、消化系統、肝臓、脾臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部または首、神経（中枢および抹消）、リンパ系、骨盤、皮膚、柔組織、脾臓、胸、尿生殖部に位置する腫瘍が含まれるが、これに限られるものではない。

【0118】

同様に、その他の過剰増殖障害についても、また、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドにより治療または検出し得る。このような過剰増殖障害の例として、ガンマグロブリン過剰血症、ガンマグロブリン血症リンパ増殖障害、パラプロテイン血症、紫斑症、類肉腫症、セザリー症候群、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ゴーシェ病、組織球症、およびあらゆるその他の、上記で列挙される臓器システム内に位置する、腫瘍形成以外の過剰増殖病が含まれるが、これらに限られるものではない。

【0119】

感染症

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、病原菌の処理または検出において使用し得る。例えば、免疫応答を高めること、特にB細胞および／またはT細胞の増殖力ならびに分化を高めることにより、感染症は治療され得る。免疫応答は、存在する免疫応答を向上させるか、あるいは新しい免疫応答を提起させるかのいずれかにより高められ

10

20

30

40

50

得る。または、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、免疫応答を必然的に顕在化させることなく、直接、病原菌を抑制し得る。

【0120】

ウイルスは、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドにより処理または検出し得る病気または症状の原因となり得る病原菌の一例である。ウイルスの例として、アルボウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、バルナウイルス科、バンヤウイルス科、カリチウイルス科、サーコウイルス科、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科（肝炎）、ヘルペスウイルス科（サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、带状疱疹など）、モノネガウイルス（例えばパラミクソウイルス科、麻疹ウイルス属、ラブドウイルス科）、オルソミクソウイルス科（例えばインフルエンザ）、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科（天然痘やワクシニアなど）、レオウイルス科（例えばロタウイルス）、レトロウイルス科（HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス）およびトガウイルス科（例えばルビウイルス属）などのDNAおよびRNAウイルス系統群が含まれるが、これに限られるものではない。これらの系統群に入るウイルスは、関節炎や細気管支炎、脳炎、眼の感染症（例えば結膜炎、角膜炎）、慢性疲労症候群、肝炎（A、B、C、E、慢性活動性、デルタ）、髄膜炎、日和見感染（例えばエイズ）、肺炎、バーキットリンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性交感染症、皮膚病（例えばカボジ肉腫、いぼ）およびウイルス血症などを含み、これらに限られることはない様々な病気または症状の原因となり得る。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、これらの症状または病気のいずれかを治療または検出するために使用し得る。

【0121】

同様に、病気や症状の原因となり得る、また本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにより処理または検出し得る細菌または真菌には、放射菌類（例えばコリネバテリウム、ミコバクテリウム、ノカルジア）、アスペルギルス症、バシリラス科（例えば炭そ、クロストリジウム）、バクテロイデス科、ブラストミセス症、ボルデテラ属、ボレリア属、ブルセラ症、カンジタ症、カンピロバクター菌、コクシジオイデス症、クリプトコックス症、皮膚糸状菌症、腸内細菌科（クレブシェラ属、サルモネラ属、セラシア属、エルジニア属）、エリジペロスリックス属、ヘリコバクター、レジオネラ症、レプトスピラ属、リステリア属、マイコプラズマ目、ナイセリア科（例えばアシネトバクター属、淋病、髄膜炎菌）、パストレラ科感染症（例えばアクチノバチルス属、ヘルノフィラス、パストレラ属）、シュドモナス、リケッチア科、クラミジア科、梅毒およびブドウ球菌など、これに限られることのない、グラム陰性およびグラム陽性細菌系統群ならびに細菌が含まれる。これらの細菌または真菌系統群は、菌血症、心内膜炎、眼の感染症（例えば結膜炎、結核、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染（例えばエイズ関連感染症）、爪囲炎、プロテーゼ関連感染症、ライター症候群、百日咳や蓄膿症などの呼吸管感染症、敗血症、ライム病、猫ひっかき病、赤痢、パラチフス、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎、クラミジア、梅毒、濡不テリア、ハンセン病、パラ結核症、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿瘍疹、リウマチ熱、猩紅熱、性交感染症、皮膚病（例えばフレグモーネ、皮膚糸状菌症）、妊娠中毒症、尿管感染症、傷感染症を含むが、これらに限られることのない病気や症状の原因となり得る。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、これらの症状または病気のいずれかを治療または検出するために使用し得る。

【0122】

さらに、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドにより処理または検出し得る、病気や症状の原因である規制菌には、アメーバ症、ピロプラズマ病、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症、蟻疫、外部寄生虫、ランブル鞭毛虫症、蠕虫病、リーシュマニア症、タイレリア症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ症およびトリコモナス症が含まれるが、これに限られるものではない。これらの寄生体は、疥癬、ツツガムシ病、眼の感染症、腸の病気（例えば赤痢、ランブル鞭毛虫症）、肝臓病、肺病、日和見感染症（例えばエイズ関連）、マラリア、妊娠合併症およびトキソプラズマ症を含

むが、これらに限られることのない様々な病気や症状の原因となり得る。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、これらの症状または病気のいずれかを治療または検出するために使用し得る。

【0123】

好ましくは、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用する治療においては、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、あるいは患者から細胞を取り出し、その細胞に本発明におけるポリヌクレオチドを補給し、患者に処理が施された細胞を戻す方法（半ビボ療法）のいずれかにより可能である。さらに、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、感染症に対する免疫応答を高めるためのワクチンに含まれる抗原として使用し得る。

10

【0124】

再生

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、組織の再生につながる、細胞の分化、増殖および誘引において使用し得る（サイエンス誌第276号、59～87頁（1997年）参照）。組織の再生は、先天性欠損、外相（傷や火傷、切り口または潰瘍）、加齢、病気（例えば骨粗しょう症、骨関節症、歯周病、肝臓疾患）、美容整形手術を含む手術、繊維症、再灌流傷害または体シトキン損傷により損傷を受けた組織を修復、交換または保護するために使用され得る。

【0125】

本発明を使用することで再生可能な組織には、臓器（例えば脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮）、筋肉（平滑筋、骨格筋または心筋）、管（脈管内皮を含む）、神経、血液生成および骨格（骨、軟骨、腱および靭帯）組織が含まれる。好ましくは、再生は、傷を残すことなく、または僅かに傷が残る程度において発生する。

20

【0126】

さらに、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、治癒が難しい組織の再生力を向上し得る。例えば、腱や靭帯の再生力が高められることにより、損傷を受けた後の回復時間が短縮される。本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、損傷を回避する努力において予防的に使用され得る。治療可能な特定の病気には、腱炎、手根管症候群およびその他の腱または靭帯欠陥が含まれる。更なる非治癒傷の組織再生例として、圧力潰瘍、血管の機能不全に関連する潰瘍、手術痕及び外傷痕が含まれる。

30

【0127】

同様に、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドを使用して神経細胞を増殖し、分化することにより、神経および脳組織も再生し得る。この方法により治療可能な病気には、中枢および抹消神経系の病気や、神経病患者または機能障害および外傷障害（例えば脊髄の障害、頭部外傷、脳血管病および脳卒中）が含まれる。特に、抹消神経疾患や末梢神経障害（例えば化学療法やその他の医療法の結果発生する障害）、局所神経障害、中枢神経系の病気（例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンティングトン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症およびシャイ・ドレーガー症候群）に付随する病気は、全て、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドを使用することにより治療し得る。

【0128】

走化性

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、走化機能を有し得る。走化分子が、細胞（例えば単核細胞、繊維芽細胞、好中球、T細胞、マスト細胞、エオシン好性細胞および／または内皮細胞）を、炎症や感染症などの体内における特定部位あるいは超増殖部位に誘引または移動させる。移動した細胞は、次に、特定の外傷または異常と戦い、さらに／または治癒し得る。

40

【0129】

本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、特定細胞の走化機能を向上し得る。これらの走化分子は、結果的に、体内の特定局所に対しターゲットとなっている細胞数を増やすことにより、炎症や感染症、超増殖障害またはあらゆる免疫システム障害の治

50

療において使用し得る。例えば、走化分子は、免疫細胞を疾病局所に誘引することにより、傷やその他の組織に対する外傷の治療において使用し得る。本発明における走化分子は、また、傷を治療するために使用し得る繊維芽細胞を誘引し得る。

【0130】

また、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドにおいては、走化機能の阻止が企図される。これらの分子は、また、障害を治療するために使用し得る。このため、本発明におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、走化抑制体として使用し得る。

【0131】

結合機能

本発明におけるポリペプチドは、ポリペプチドに結合する分子またはポリペプチドが結合する分子のふり分けにおいて使用し得る。ポリペプチドと分子が結合することにより、結合されたポリペプチドまたは分子の活動を活性化（作用）、増強、抑制（拮抗）あるいは減少し得る。このような分子の例として、抗体やオリゴヌクレオチド、蛋白質（例えばレセプタ）または小分子が含まれる。

【0132】

好ましくは、当分子は、例えば配位子の断片または自然基質などのポリペプチドの自然配位子、配位子、構造あるいは機能的模倣に密接に関係する（コリガン他「免疫学における最新実験記録第1（2）巻第5章（1991年）参照」。同様に、当分子は、ポリペプチドが結合するレセプタまたは少なくともポリペプチドにより結合される可能性があるレセプタの断片（例えば活性部位）に密接に関係し得る。何れの場合も、当分子は、既知の技法を用いることで、合理的に設計され得る。

【0133】

好ましくは、これらの分子のふり分けにおいて、ポリペプチドを分泌蛋白質としてあるいは細胞膜上に発現させる適切な細胞の生成に関連する。好ましい細胞には、哺乳動物、酵母、キロショウジョウバエ属または大腸菌が含まれる。ポリペプチドを発言させる細胞（または発現されたポリペプチドを含む細胞膜）は、次に、好ましくは、ポリペプチドまたは分子のいずれかの活動の結合、刺激または抑制を観察するために、潜在的に分子を含む試験化合物に接触される。

【0134】

アッセイでは、単に、結合がラベルにより、または標識付けされた競争相手との競争が含まれるアッセイにおいて検出される、ポリペプチドに結合する化合物候補を試験し得る。さらに、アッセイでは、化合物候補がポリペプチドに対する結合により発生する信号となるか否かについても試験し得る。

【0135】

あるいは、アッセイは、無細胞調整法や、固体担体添付されるポリペプチド／分子、化学ライブラリまたは自然生産物混合物を用いて実行し得る。アッセイは、また、化合物候補とポリペプチドを含む溶液との混合工程や、ポリペプチド／分子活動または結合を測定する工程、ならびにポリペプチド／分子活動または結合を基準と比較する工程から構成され得る。

【0136】

好ましくは、ELISAアッセイでは、単クローン抗体または多クローン抗体を用いて、サンプル（例えば生物学的サンプル）内におけるポリペプチドのレベルまたは活動を測定し得る。抗体は、ポリペプチドに直接または間接的に結合するか、基質を得るためにポリペプチドと競争するかのいずれかにより、ポリペプチドのレベルまたは活動を測定し得る。

【0137】

これらの上記の全アッセイは、診断マーカあるいは予後マーカとして使用し得る。これらのアッセイにより発見された分子は、ポリペプチド／分子を活性化させるか、または抑制することにより、病気の治療において、または患者に特定の結果（例えば血管の発育）をもたらすために使用し得る。さらに、アッセイでは、妥当に処理された細胞または組織か

らポリペプチドを生成する作用を抑制または増長し得る因子を発見し得る。

【0138】

このため、本発明には、本発明におけるポリペプチドに結合する化合物を識別するための、(a)本発明におけるポリペプチドを用いて結合化合物候補を培養する工程と、(b)結合が発生しているかについて決定を行う工程とから構成される方法が含まれる。さらに、本発明には、作用・拮抗を識別するための、(a)本発明におけるポリペプチドを用いて化合物候補を培養する工程と、(b)生物活性をアッセイする工程と、(c)ポリペプチドの生物活性に変化が見られるかを決定するための工程とから構成される方法が含まれる。

【0139】

その他の機能

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、上記で考察される造血系列のほかに、胚幹細胞の分化または増殖を促進あるいは減退し得る。

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、身長、体重、紙の色、目の色、肌、脂肪組織の比率、色素形成、大きさおよび形状（例えば美容手術）などの哺乳類の特性を調製し得る。同様に、本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、エネルギーの異化、同化、処理、利用および保存に影響を及ぼす哺乳類の代謝を調整し得る。

【0140】

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、バイオリズムや概日リズム、憂鬱（抑鬱障害を含む）、暴力傾向、痛みに対する許容性、再生能力（好ましくはアクチビンまたはインヒビンのような活動）、ホルモンまたは内分泌レベル、食欲、性的衝動、記憶、ストレスまたはその他の認識品質に影響を与えることにより、哺乳類の精神的状態あるいは肉体的状態を変化するために使用し得る。

【0141】

本発明におけるポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、また、保存能力や脂肪含有量、脂質、蛋白質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、共同因子またはその他の栄養成分を増大または減少させるなど、食物添加物または保存剤として使用し得る。

その他の好ましい実施態様

請求を行う発明のその他の好ましい実施態様には、少なくとも80%の、好ましくは少なくとも85%において、より好ましくは少なくとも90%において、最も好ましくは少なくとも95%において、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 1-62内で隣接する少なくとも50個以上のヌクレオチドの配列と同一のヌクレオチド配列から構成される遊離ヌクレイン酸分子が含まれる。

【0142】

また、好ましいヌクレイン酸分子の場合、上記隣接ヌクレオチド配列は、クローン配列の5'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドから、クローン配列の3'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドまでの位置範囲において、SEQ ID NO: 1-62のヌクレオチド配列内に存在する。

【0143】

また、好ましいヌクレイン酸分子の場合、上記隣接ヌクレオチド配列は、スタートコドンの5'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドから、SEQ ID NO: 1-62に対し規定されるクローン配列の3'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドまでの位置範囲において、SEQ ID NO: 1-62のヌクレオチド配列内に存在する。

【0144】

同様に、好ましいヌクレイン酸分子の場合、上記隣接ヌクレオチド配列は、シグナル・ペプチドの第一アミノ酸の5'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドから、SEQ ID NO: 1-62に対し規定されるクローン配列の3'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドまでの位置範囲において、SEQ ID NO: 1-62のヌクレオチド配列内に存在する。

10

20

30

40

50

【0145】

また、好ましい遊離ヌクレイン酸分子の場合、少なくとも95%において、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 1-62内の隣接する少なくとも150個以上のヌクレオチドの配列と同一のヌクレオチド配列から構成される。

【0146】

さらに、好ましい遊離ヌクレイン酸分子の場合、少なくとも95%において、ヌクレオチド配列SEQ ID NO: 1-62内の隣接する少なくとも500個以上のヌクレオチドの配列と同一のヌクレオチド配列から構成される。

【0147】

さらに好ましい実施態様は、少なくとも95%において、シグナル・ペプチドの第一アミノ酸の5'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドから、SEQ ID NO: 1-62に対し規定されるクローン配列の3'ヌクレオチド位置あたりのヌクレオチドまでの、SEQ ID NO: 1-62のヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列から構成されるヌクレイン酸分子である。 10

【0148】

さらに好ましい実施態様は、少なくとも95%において、SEQ ID NO: 1-62の完全ヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列から構成される遊離ヌクレイン酸分子である。

【0149】

また、ヌクレイン酸分子への厳しい交雑条件下において交雑が行われる遊離ヌクレイン酸分子が好ましいが、交雑を行う上記ヌクレイン酸分子は、A残基のみまたはT残基のみから構成されるヌクレオチド配列を有するヌクレイン酸分子に厳しい交雑条件下において交雑されないことを特徴とする。 20

【0150】

さらに好ましい実施態様として、生物学的サンプル内に存在する、SEQ ID NO: 1-62から構成されるグループから選択される配列内における少なくとも50個の隣接するヌクレオチドの配列に少なくとも95%において同一のヌクレオチド配列から構成されるヌクレイン酸分子を検出する方法があり、この方法は、前記サンプル内における少なくとも一つのヌクレイン酸分子を有するヌクレオチド配列と、前記グループから選択される配列とを比較し、前記サンプル内における前記ヌクレイン酸分子が少なくとも95%において前記選択配列と同一であることを決定する工程から構成される。 30

【0151】

また上記の方法について、好ましくは、前記配列比較工程には、前記サンプル内におけるヌクレイン酸分子と、前記グループから選択される前記配列から構成されるヌクレイン酸分子間におけるヌクレイン酸交雑程度を決定する工程が含まれる。同様に、また上記方法について、好ましくは、前記配列比較工程は、上記サンプル内におけるヌクレイン酸分子から決定されるヌクレオチド配列と、前記グループから選択される前記配列とを比較することで実行され、ヌクレイン酸分子は、DNA分子またはRNA分子から構成し得るものである。

【0152】

さらに好ましい実施態様として、生物学的サンプルの種、組織または細胞形式を識別するための方法があり、この方法は、SEQ ID NO: 1-62から構成されるグループから選択される配列内において少なくとも50個の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも95%において同一のヌクレオチド配列から構成されるヌクレイン酸分子が、前記サンプル内に存在する場合、その分子を検出する工程から構成される。また、好ましくは、被験者に内在する、遺伝子の異常構造または異常表現に付随する病理学的状態を診断する方法があり、この方法は、SEQ ID NO: 1-62ヌクレオチド配列から構成されるグループから選択される配列内において少なくとも50個の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも95%において同一のヌクレオチド配列から構成されるヌクレイン酸分子が、上記被験者から入手される生物学的サンプル内に存在する場合、その分子を検出す 40 50

工程から構成される。

【0153】

病理学的状態を診断するための方法は、少なくとも2本のヌクレオチド配列を有するパネル内にあるヌクレオチド配列から構成されるヌクレイン酸分子を検出する工程から構成され、ここでは、前記パネル内の一本の配列は、前記グループから選択される配列内にある少なくとも50個の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも95%において同一である。

【0154】

また好ましくは、遊離ヌクレイン酸分子から構成される組成が重要であり、前記ヌクレイン酸分子のヌクレオチド配列は、少なくとも2本のヌクレオチド配列を有するパネルから構成され、前記パネル内の少なくとも一本配列は、SEQ ID NO: 1-62ヌクレオチド配列から構成されるグループから選択される配列内において少なくとも50個の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも95%において同一であり、ヌクレイン酸分子は、DNA分子またはRNA分子から構成し得るものである。

10

【0155】

また、好ましくは、遊離ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列内の少なくとも約10個の隣接するアミノ酸の配列と少なくとも90%において同一のアミノ酸配列から構成される。

【0156】

また、好ましいポリペプチドは、前記の隣接するアミノ酸の配列が、分泌蛋白質の第一アミノ酸位置あたりの残基から転写読解枠の第一アミノ酸あたりの残基までの位置範囲において、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列内の酸内に含まれる。

20

【0157】

また、好ましくは、遊離ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列内の少なくとも約30個の隣接するアミノ酸の配列に少なくとも95%において同一のアミノ酸配列から構成される。

【0158】

さらに好ましくは、遊離ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列内の少なくとも約100個の隣接するアミノ酸の配列に少なくとも95%において同一のアミノ酸配列から構成される。

30

【0159】

さらに好ましくは、遊離ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列内の酸に少なくとも95%において同一のアミノ酸配列から構成される。

【0160】

さらに好ましくは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列内の少なくとも10個の隣接するアミノ酸の配列に少なくとも90%において同一のアミノ酸配列から構成されるポリペプチドを生物学的サンプルから検出する方法であり、この方法は、前記サンプル内に1個以上のポリペプチド分子を有するアミノ酸配列と、前記グループから選択される配列とを比較し、前記サンプル内の前記ポリペプチド分子を有する配列、が少なくとも90%において、10個以上の隣接するアミノ酸を有する前記配列と同一であることを決定する工程から構成される。

40

【0161】

また、好ましくは、上記の方法において、前記サンプル内に1個以上のポリペプチド分子を有するアミノ酸配列と、前記グループから選択される配列とを比較する工程が、前記サンプル内のポリペプチドの、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列内の10個以上の隣接するアミノ酸の配列に少なくとも90%において同一のアミノ酸配列から構成されるポリペプチドと特に結合する抗体に対する固有結合範囲を決定する工程から構成される。

50

【0162】

また、好ましくは、上記の方法において、前記配列比較工程が前記サンプル内のポリペプチド分子から決定されるアミノ酸配列と、前記グループから選択される前記配列とを比較することにより実行される。

【0163】

また、好ましくは、生物学的サンプルの種、組織または細胞形式を識別するための方法があり、この方法は、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列内の10個以上の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも90%において同一のアミノ酸配列から構成されるポリペプチド分子が、前記サンプル内に存在する場合、その分子を検出する工程から構成される。

10

【0164】

また好ましくは、上記の、生物学的サンプルの種、組織または細胞形式を識別するための方法は、少なくとも2本のアミノ酸配列を有するパネル内にあるアミノ酸配列から構成されるポリペプチド分子を検出する工程から構成され、ここでは、前記パネル内の少なくとも一本の配列は、前記グループから選択される配列内の10個以上の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも90%において同一である。

【0165】

また、好ましくは、被験者に内在する、遺伝子の異常構造または異常表現に付随する病理学的状態を診断する方法があり、この方法は、前記被験者から入手される生物学的サンプル内に存在する、少なくとも2本のアミノ酸配列を有するパネル内にあるアミノ酸配列から構成されるポリペプチド分子を検出する工程から構成され、ここでは、前記パネル内の少なくとも一本の配列は、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列内の10個以上の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも90%において同一である。

20

【0166】

これらの方法の何れにおいても、前記ポリペプチド分子の検出工程では、抗体の使用が含まれる。

また、好ましくは、ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列に少なくとも95%において同一のヌクレオチド配列から構成される遊離ヌクレイン酸分子であり、ここでは、前記ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列内の10個以上の隣接するヌクレオチドの配列と少なくとも90%において同一であるアミノ酸配列から構成される。

30

【0167】

また、好ましくは、遊離ヌクレイン酸分子であり、ここでは、前記のポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列が、原核生物宿主内の前記ポリペプチドの表現に対し最適化されている。

【0168】

また、好ましくは、遊離ヌクレイン酸分子であり、ここでは、前記ヌクレオチド配列が、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ酸配列から構成されるグループから選択される配列から構成されるポリペプチドのコード化を行う。

40

【0169】

さらに好ましくは、上記遊離ヌクレイン酸分子のいずれかをベクター内に挿入する構成の、組換えベクター生成方法がある。また、この方法により作り出される組換えベクターも好ましい。また、好ましくは、ベクターを宿主細胞に導入する構成の、組換え宿主細胞生成方法があり、この方法により生成される組換え宿主細胞が好ましい。

【0170】

また、好ましくは、前記ポリペプチドが表現される条件下においてこの組換え宿主細胞を培養し、前記ポリペプチドを回復させる構成の、遊離ポリペプチド生成方法がある。また、好ましくは、この遊離ポリペプチド生成方法において、前記組換え宿主細胞が真核細胞であり、前記ポリペプチドは、SEQ ID NO: 1-62から書き換えられるアミノ

50

酸配列から構成されるグループから選択される配列から構成されるヒトが分泌する蛋白質の分泌部である。この方法により作り出される遊離ポリペプチドも、また、好ましい。

【0171】

また、好ましくは、分泌蛋白質の活動レベルを強化する必要がある個人を治療する方法であり、この方法は、このような個人に、遊離ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、または前記個人における前記蛋白質活動レベルを強化するのに有効な、請求を行う本発明による抗体のある量から構成される製薬剤を投与する構成となる。

【0172】

当発明を総括的に説明してきたが、以下に示される、但しこれらに制限されることない例証を参照することにより、さらに容易に理解されることになる。

実施例1：インビボDSS処理により調整されるポリヌクレオチドの識別および特性付け大腸炎を誘発するため、DSS (MW 40,000) を飲料水に溶解し、7日間にわたり、任意値にマウスに与え、その後DSS水を普通の飲料水と取り替えることにより、マウスの個別系統において、DSS大腸炎に対する異なる感受性が立証される。C57BL/6マウスに急性大腸炎を誘発させるためには、3%DSSで十分であり、BALB/cマウスに急性大腸炎を誘発させるためには、5%DSSが必要である。

【0173】

本研究の目的において、腸のサンプルは、3%DSSを使って処置が行われたC57BL/6マウス群から採取された。組織は、0日目、4日目、8日目または12日目に採取したが、この日程は、回復に抗して腸の損傷を完全に誘発するための日程取りとした。

【0174】

腸組織に対する損傷は、IBDの顕著な特徴であり、DSS誘発大腸炎マウスモデルは、腸組織に損傷を起こしており、それ自体、IBDの研究においてより有益なモデルのうちの一つである。

【0175】

マウスは、上述のように、飲み水にDSSを混ぜる方法により処置が行われた。DSS処置中の様々な時点において、マウス群は、解剖により腸が取り出された。解剖により取り出された新鮮な腸組織は、直ちに、GT緩衝液 (4.5Mグアニジニウム・イソチオシアネート、50mMクエン酸塩ナトリウム、0.5%w/vサルコシルナトリウム、2%2-mercaptoethanol) に入れられ、均質化が行われた。均質溶解物は、短くスピンさせ、CsCl勾配に層状に積重ねる前に、大きめの碎片を取り除いた。RNAは、従来法により抽出し、その後TOGA分析において使用した。

DSS誘発大腸炎の特徴

4日目から、マウスの体重の減少が明白になる。腸の組織分析により、上皮細胞および杯状細胞の損失により識別される初期寄せ集め病変の存在が明らかになる。8日目までに体重の減少はかなり深刻になり (約20%の減少)、マウスは瀕死状態を呈する。組織学的に、腸の上皮は、この段階で、ほとんど、全体として破壊され、大きな混合炎症細胞の基底膜および粘膜下組織への浸潤が認められる。炎症細胞の浸潤は、主に、T細胞、B細胞および顆粒球から構成されるように思われる。12日目までに、マウスが回復するため、体重の増加が明らかであり、この最後の段階において、地下回復および上皮再生により、修復工程の開始について、組織学的に証拠立てられる。

【0176】

遊離RNAは、J・Gサトクリフ他、Proc Natl Acad Sci USA 2000、2月29日、97(5)、1976~1981、国際公開出願PCT/US99/23655、米国特許第5,459,037号、同第5,807,680号、同第6,030,784号で述べられる、これにより参照により本書に組み入れる、TOGA (全遺伝子発現分析) として知られるmRNAの同時配列特定識別法を用いて、分析を行った。好ましくは、TOGA法またはその他の方法を応用する前に、遊離RNAは、当分野で既知の方法により開始ポリA含有mRNA固体群を形成するために濃縮が行われた。このような好ましい実施態様では、TOGA法は、さらに、4個の5'プライマーのうちの

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

各ライブラリの約数は、3'のcDNA挿入部およびその側面に位置する配列を離れながら、親ベクター内の幾つかの部位における裂け目により線形化に影響を及ぼすMspIにより消化された。生成物は、T3 RNAポリメラーゼ（アンピオン社製のメガスクリプトキット）を用いて培養することにより、元々のcDNAからMspIおよびNotI部位に隣接する既知のベクター配列を有するクローン挿入部のアンチセンスcRNAを生成

した。

【0182】

この段階において、各cRNA調整は、3段階方式において行われた。最初のステップでは、5'のRTプライマー(A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G(SEQ ID NO:64))を用いて、259 ngのcRNAを第一鎖cDNAに変換した。第二ステップでは、400 pgのcDNA生成物を、それぞれ「万能」3'PCRプライマーG-A-G-C-T-C-C-A-C-C-G-C-G-G-T(SEQ ID NO:66)と組み合わせる、G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N(SEQ ID NO:65)形式の4つの5'のプライマーの各々との別個の4種類の反応におけるPCRテンプレートとして使用した。

10

【0183】

3番目のステップにおいて、格差部プールにおける生成物を、さらに、各々10 ngのフルオレセイン化「万能」3'PCRプライマー、6-FAMに結合するオリゴヌクレオチド(SEQ ID NO:66)、ならびにC-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N-N(SEQ ID NO:67)形式の適切な5'PCRプライマーを用い、人工的なミスプライミングを最小限に抑え、忠実度の高いコピーを促進するために、各5'PCRプライマーのT_mより僅かに高い温度Xにおいてアニーリングを行う工程が含まれるプログラムを使って、二番目のPCR反応に対し、64個のサブサブプール(20 μl中2 ng)に分割した。各ポリメラーゼ連鎖反応工程は、TaqStarter抗体(クロンテック社)の面前で行われた。

20

【0184】

各組織サンプルにおける最後のポリメラーゼ連鎖反応工程から生成される生成物は、自動化ABI Prism 377シーケンサを使って、一連の変性DNA配列決定ゲル上において分析し、GeneScanソフトウェアパッケージ(ABI社)を使って、データの収集を行い、増幅および移動を行うために標準化を行った。この一連の反応を完全に実行することにより、最初のPCR反応における5'PCRプライマーにより確立される4つのプールのそれぞれに対し64個の生成物サブプールが作られ、2番目のPCR反応の全5'PCRプライマーセットについては、合計で256個の生成物サブプールが作られた。

【0185】

上記で説明したDSS処置後の各時点において採取したmRNAサンプルの分析を行った。表1は、cDNAから決定される414個のmRNAの発現レベルの概要である。これらのcDNA分子は、そのデジタルアドレス、すなわち、分子の長さでカップリングされる部分5'終点ヌクレオチド配列とともに、処置後の異なる時間間隔において生成される分子の相対量により識別され、5'終点部分ヌクレオチド配列は、MspIを認識するための認識部位と、最後のPCR工程で使用される5'PCRプライマーの解析塩基を有するヌクレオチド配列とにより決定される。断片のデジタルアドレス長さは、鎖曲線上の補間により決定したが、それ自体、配列決定により決定される実際の長さに対し、±1~2 b.p.の間で変化し得る。

30

【0186】

例えば、表1に記入のある、デジタルアドレスMspI AGTG244により識別されるDNA分子の記述において、さらに、CGGAGTG形式の、デジタルアドレス長さが244 b.p.の5'終点部分ヌクレオチド配列を有しているとして特徴付けられる。MspI AGTG244として識別されるDNA分子については、さらに、0日目、4日目および8日目において増加するレベルで発現することが分かり、12日目では緩やかに下降している。但し、本処置では、0日目に見られる比較的高いレベルから4日目と8日目には減退するが、12日目には増加するMspI AGTA187発現パターンとは異なるパターンとなっている。

40

【0187】

同様に、表1においてそのMspIデジタルアドレスにより識別される他の412 DNA

50

分子は、さらに、D S S 処置終了後の 0 日目、4 日目、8 日目および 1 2 日目における遺伝子発現レベルのパターンにより特徴付けられる。数多くの分離クローンについて、表 2 および表 3 で特徴づけを行っているが、そのヌクレオチド配列は、下記の配列リストにおける S E Q I D N O : 1 - 6 2 として規定される。

【0188】

図 1 で示されるデータは、5' 終点において 6-カルボキシフルオレセイン (A B I 社製 6 F A M) により標識付けされる「万能」3' プライマー (S E Q I D N O : 6 6) と組み合わされる 5' P C R プライマー (C - G - A - C - G - G - T - A - T - C - G - G - C - G - C - G、S E Q I D N O : 6 8) により作成した。P C R 反応生成物は、4. 5 % アクリルアミドゲル上においてゲル電気泳動により溶解し、A B I 3 7 7 に

10

【0189】

パーシング塩基 C G C G (S E Q I D N O : 6 8) を用いる 5' P C R プライマーを使った T O G A 分析結果を、図 1 に示すが、ここでは、D S S を用いる 7 日間のコース終了後の 0 日目 (図 1 A)、4 日目 (図 1 B)、8 日目 (図 1 C) または 1 2 日目 (図 1 D) のマウスから分離した腸から (上下パネル) 抽出した m R N A から生成される P C R 生成物を示す、パーシング塩基 C G C G を用いる 5' P C R プライマーを使った T O G A 分析について述べられている。縦方向の指標線は、0 日目に現れ、4 日目には減少し、8 日目には大きく増加し、1 2 日目にはその発現は総体的に減少するが、それでも上昇傾向を示す約 4 5 8 b. p. の P C R 生成物を示している。

20

【0190】

区別的に提供されている幾つかの生成物は、その生成物が、G e n B a n k から抽出したデータとの比較に基づき、新規性が示唆された位置において移動しているように思われた。これらの場合、P C R 生成物は、分離し、T O P O ベクター (インビトロジェン社) 内にクローン化し、両方の鎖上において配列を決定した。下記の表 4 に、その例を示す。分離されたクローンが同じピークのものであることを立証するために、基質として最初の P C R 反応において生成された c D N A を用いて、P C R を行った。例えば、上記で開示される 4 5 8 b. p. 生成物の場合、オリゴヌクレオチドは、万能 3' P C R プライマーと、3 末端において延在する、クローン配列 3' からパーシング塩基 (この場合 C G C G) に追加されるヌクレオチドを有する、第二 P C R 工程における 5' P C R プライマーに相当する 5' P C R プライマーとを使って合成した。この延在 5' プライマーの配列は、G A T C G A A T C C G G C G C G C A C G G G G A C C A G A C (S E Q I D N O : 7 8) であった。

30

【0191】

当生成物は、電気泳動により分離し、クロンの長さを、図 2 で示される原初 P C R 生成物の長さと比較した。図 2 A では、上記で述べられるように誘導された P C R 生成物の長さ (ピーク値としての) を示す。図 2 B では、S E Q I D N O : 6 8 および S E Q I D N O : 6 6 の原初 P C R プライマーを用いて生成した P C R 生成物を示す (図 1 A と比較する)。図 2 C では、上部および中央パネルからの痕跡が重ね描きされており、分離クロンの配列を用いた P C R 生成物の長さは、原初 P C R 性セ物の長さと同じであることが立証される。

40

【0192】

同じ手順を使用して、データベース内のデータとの一致性について検証を行った。下記の図 4 に、その結果を示す。各事例において、オリゴヌクレオチドは、万能 3' P C R プライマーと、3 末端において延在する、識別され一致する G e n B a n k 配列における終端 M s p I 部位に近接する配列から追加されるヌクレオチドを有する、第二 P C R 工程における 5' P C R プライマーに相当する 5' P C R プライマーとを使って合成した。3 つの事例において (S E Q I D N O : 2 1 の I M X 2 - 3 3 と、S E Q I D N O : 6 1 の I M X 2 - 3 4 と、S E Q I D N O : 6 2 の I M X 2 - 7 0)、列挙される

50

D S T 配列が、G e n B a n k の検証済みデータベース一致配列から取得された。

【0193】

図3は、S E Q I D N O : 10のI M X 2 _ 4 6 クローンのノーザンブロット分析結果をグラフで表したものであり、4つの実験サンプル（処置後0日目、4日目、8日目または12日目）から抽出されたポリA濃縮m R N A 含有アガロースゲルとサイズ標準を、電気泳動後にブロットし、放射性同位元素を使って識別されるS E Q I D N O : 10のI M X 2 _ 4 6 を用いて精査し、ホスフォイメージャーを使って造影し、定量化を行った。1.6 kb 写しの相対発現レベルを示す定量結果は、0日目が64、4日目が53、8日目が223、12日目が269であった。ゲル上に搬入されるR N A の量は、シクロフィリン（「シク」）に対し精査により決定した。

10

【0194】

【表1】

表1						
Seq ID	クローンID	デジタルアドレス (MspI)	0 日	4 日	8 日	12 日
		AAAA 157	405	247	181	459
		AAAA 316	42	34	47	174
51	IMX2 65	AAAC 186	3722	1457	4314	5810
50	IMX2 1	AAAC 407	95	106	345	281
		AAAG 449	214	121	249	299
		AACA 377	84	50	197	107
59	IMX2 2	AACG 299	79	108	366	91
		AATC 318	326	174	36	72
60	IMX2 3	AATG 114	210	136	1059	514
		ACAA 227	110	496	1568	564
		ACAA 381	51	57	120	69
		ACAC 283	131	69	212	143
1	IMX2 4	ACAC 320	28	38	284	106
26	IMX2 5	ACAC 398	29	37	94	70
		ACAG 288	69	67	264	101
		ACAT 335	767	362	231	449
		ACCA 359	652	134	227	452
		ACCC 493	128	332	316	398
		ACCG 387	218	60	149	570
		ACCT 225	851	189	650	1106
27	IMX2 6	ACCT 364	173	92	530	142
		ACGA 171	761	192	909	790
		ACGA 206	618	984	2071	1168
		ACGA 235	623	489	1511	1276
		ACGA 326	514	1217	805	722
		ACGC 361	455	97	227	299
		ACGG 198	1483	2094	5210	3294
52	IMX2 66	ACGG 238	1576	537	1476	1734
		ACGG 409	405	172	473	800
		ACGG 449	102	66	69	152
		ACGT 174	743	401	265	615
		ACTA 333	555	181	305	468
		ACTC 111	468	488	1773	1095
28	IMX2 7	ACTC 171	55	242	1326	651
		ACTG 184	1889	742	596	924
		ACTG 319	67	130	22	91
		ACTT 292	51	39	180	177
		AGAA 104	325	215	319	546
		AGAA 263	423	840	1050	1197
		AGAC 487	1568	826	354	1594
		AGAG 110	1692	2388	3206	1620
		AGAG 205	710	300	547	453

【 0 1 9 5 】

【 表 1 】

		AGAG	318	283	166	139	452
		AGAG	329	300	125	234	400
		AGAG	372	158	94	193	272
		AGCA	251	1125	353	659	1187
29	IMX2 8	AGCA	285	314	2300	1575	1050
		AGCA	316	158	656	179	174
		AGCC	379	439	148	366	544
		AGCG	258	278	176	543	239
		AGCG	284	163	39	25	87
		AGCG	396	476	57	261	605
		AGCT	175	920	1790	1538	1268
		AGCT	230	179	192	33	132
		AGGA	163	691	924	1919	830
		AGGA	190	1099	473	638	791
		AGGA	266	354	106	74	133
		AGGA	332	63	192	130	58
		AGGA	381	20	88	49	33
		AGGC	367	599	165	273	723
		AGGC	410	4628	1660	5080	4468
		AGGT	101	316	524	211	133
		AGGT	282	169	55	30	64
		AGGT	304	47	33	39	133
		AGGT	485	403	181	292	421
		AGTA	187	1331	412	457	753
		AGTA	209	194	331	365	412
		AGTA	285	62	257	269	164
		AGTC	288	101	354	197	163
		AGTC	324	665	319	66	112
30	IMX2 11	AGTC	476	51	150	661	373
31	IMX2 12	AGTG	244	165	338	2558	1077
		AGTT	101	92	235	234	70
		AGTT	248	70	164	303	124
		ATAA	170	410	116	241	315
41	IMX2 39	ATAA	226	38	44	174	69
		ATAA	261	485	282	891	766
32	IMX2 13	ATAC	226	174	303	598	221
		ATAC	275	954	756	1600	1133
		ATAG	110	4836	1250	1558	3142
		ATAG	151	1774	630	919	1402
		ATAG	223	513	584	1488	1078
		ATAG	323	1044	599	1180	1349
		ATAG	403	187	79	110	225
		ATCA	87	1018	1221	1588	664
		ATCA	121	671	263	160	314
		ATCA	466	376	150	251	298
		ATCC	224	89	175	382	232
		ATCC	304	489	245	553	537

10

20

30

40

【 0 1 9 6 】

【 表 1 】

		ATCC	347	229	106	283	291
		ATCC	451	309	112	187	295
		ATCG	137	399	111	147	135
		ATCG	205	67	240	341	76
		ATCG	362	61	44	165	94
		ATCG	464	393	139	330	394
		ATCT	392	208	72	123	236
		ATGA	203	743	1154	1968	1196
		ATGA	275	425	255	680	395
		ATGA	286	460	167	143	330
		ATGC	126	1310	551	609	711
		ATGG	196	284	470	636	361
		ATGG	349	481	588	178	439
		ATTA	105	432	233	67	94
		ATTA	162	568	201	235	399
		ATTA	263	104	48	51	69
		ATTG	140	1744	870	1490	2200
		CAAA	267	94	77	244	127
		CAAA	310	405	145	404	441
		CAAA	359	1777	461	594	1572
		CAAC	267	868	129	357	710
		CAAC	338	469	131	342	468
		CAAC	347	378	174	230	486
		CAAC	362	289	125	620	369
		CAAG	464	162	42	112	198
		CAAG	479	87	42	59	105
		CAAT	132	983	727	1005	1669
		CAAT	188	2436	1137	2640	3409
		CAAT	279	374	449	123	377
		CAAT	311	108	102	41	110
		CACA	392	150	55	41	137
		CACC	86	682	1597	1849	916
		CACC	360	85	92	280	89
		CACC	386	242	65	133	222
		CACC	394	45	47	135	39
		CACG	92	2188	4464	5216	2074
		CAGA	276	43	49	145	129
		CAGC	116	3026	6760	2728	3430
		CAGG	315	299	84	145	335
		CAGG	421	55	79	185	163
		CATC	162	1182	2890	1216	1262
		CATC	334	389	332	196	702
		CATC	368	176	57	103	162
		CATG	257	532	157	326	468
		CATG	353	2449	321	1050	1948
42	IMX2 40	CATT	90	299	2530	3750	823
		CATT	331	52	127	194	33

10

20

30

40

【 0 1 9 7 】

【 表 1 】

		CATT	347	449	72	261	393
		CCAA	126	2480	589	976	1713
		CCAA	166	1119	1451	960	545
43	IMX2 42	CCAA	201	242	1101	645	304
8	IMX2 43	CCAA	272	70	439	261	75
		CCAA	309	319	87	203	458
		CCAA	344	185	1389	992	201
		CCAC	178	85	295	222	122
		CCAC	248	1237	3609	891	1472
		CCAC	291	345	141	179	291
		CCAC	354	198	95	47	189
		CCAG	274	238	112	165	248
		CCAG	424	181	69	94	167
		CCAT	85	160	192	198	80
		CCAT	141	265	613	424	447
		CCAT	177	6480	4379	1011	1817
		CCCA	78	1043	1200	2301	1018
		CCCA	220	1438	773	454	463
		CCCA	255	29	27	23	79
		CCCG	102	2353	1931	3666	4085
		CCCG	211	1290	512	169	678
13	IMX2 55	CCCG	473	3711	1320	23	34
		CCCT	314	430	222	154	171
		CCCT	462	46	138	57	65
		CCGA	188	536	1180	948	647
		CCGA	207	297	803	357	340
		CCGC	114	1184	515	251	817
		CCGC	257	206	135	77	82
53	IMX2 68A	CCGC	266	286	77	289	435
54	IMX2 68B	CCGC	266	286	77	289	435
		CCGC	496	78	29	95	77
55	IMX2 69	CCGT	151	1603	264	440	1074
		CCGT	177	2085	836	411	338
		CCGT	214	1054	2000	260	512
		CCGT	252	682	1085	2385	2117
		CCGT	444	47	35	109	79
		CCGT	484	72	262	151	78
		CCTA	356	45	30	38	306
		CCTC	142	451	509	262	946
		CCTC	197	684	472	246	443
		CCTC	379	164	215	80	81
		CCTC	446	45	45	47	153
		CCTG	116	250	722	485	182
		CCTG	164	627	77	764	46
		CCTT	272	225	484	179	98
		CCTT	356	76	82	146	53
		CCTT	445	238	114	47	376

10

20

30

40

【 0 1 9 8 】

【 表 1 】

		CCTT	490	100	11	37	17
		CGAA	83	5360	4861	1634	4700
		CGAA	164	124	317	258	270
		CGAC	166	540	1253	1829	1039
		CGAC	267	503	79	680	609
		CGAC	364	169	65	415	336
		CGAG	262	23	208	146	600
		CGAG	302	373	49	217	335
		CGAG	352	120	49	155	185
15	IMX2 57	CGAT	176	1458	722	192	188
		CGCA	209	431	161	233	251
		CGCA	221	787	381	113	138
10	IMX2 46	CGCG	458	195	108	1280	793
		CGCG	460	230	89	1136	732
47	IMX2 58	CGCG	472	846	115	44	45
		CGCG	491	148	70	145	285
		CGGA	205	41	276	112	291
48	IMX2 59	CGGC	323	1873	1563	344	544
		CGGG	123	296	431	648	521
		CGGG	245	486	162	280	364
		CGGT	468	29	31	50	80
		CGTC	310	134	365	399	217
		CGTG	153	482	238	157	245
		CGTG	374	340	152	88	216
		CGTT	90	231	1068	1139	306
		CTAA	87	2094	817	719	2495
		CTAA	98	722	470	272	296
		CTAC	336	431	249	517	653
		CTAC	452	28	189	87	40
		CTAG	406	457	149	307	479
		CTAT	175	313	295	71	75
		CTAT	348	353	327	525	737
		CTCA	223	2614	726	2346	2193
		CTCA	242	66	74	172	146
		CTCA	329	143	63	84	150
		CTCA	347	179	62	57	178
		CTCA	391	3031	972	1564	2427
21	IMX2 33	CTCC	198	151	210	1699	2347
		CTCC	287	110	38	45	129
		CTCC	308	440	188	493	622
12	IMX2 48	CTCC	386	35	43	233	103
		CTCG	188	1648	225	1027	1373
		CTCG	428	157	56	220	262
49	IMX2 60	CTCG	472	486	28	15	20
		CTCT	117	111	370	213	161
		CTCT	407	59	37	107	91
		CTGC	147	300	763	888	484

10

20

30

40

【 0 1 9 9 】

【 表 1 】

		CTGC	257	908	711	2519	1665
		CTGC	414	463	70	223	550
		CTGG	200	1421	332	1230	1459
		CTGG	272	624	214	572	638
		CTGG	414	119	58	109	149
		CTTA	395	81	27	73	186
		CTTC	247	562	239	377	431
		CTTC	404	82	111	85	243
		CTTG	205	363	607	283	230
		CTTG	258	299	86	121	158
		CTTG	297	450	160	630	472
		CTTG	354	236	95	162	300
		CTTG	366	507	170	434	717
		CTTT	400	71	30	101	283
		CTTT	410	41	48	67	138
		CTTT	453	74	20	64	187
		GAAA	305	106	111	210	126
		GAAC	279	75	49	199	217
		GAAG	95	628	604	1402	449
		GACA	386	300	123	132	362
		GACA	400	802	295	412	1007
		GACC	119	217	771	217	202
		GACC	129	1056	3122	2325	1367
		GACG	89	1849	741	474	324
		GACG	169	502	538	464	179
		GACG	283	150	111	223	328
		GACG	381	43	44	161	53
		GACT	83	371	878	473	299
		GACT	315	894	554	823	1160
		GAGA	220	198	561	395	297
		GAGA	368	149	71	66	146
		GAGC	88	275	782	236	166
		GAGC	262	1703	474	511	1530
		GAGC	419	97	56	165	227
		GAGG	88	1550	2018	736	639
		GAGG	112	304	701	1046	788
		GAGG	253	143	59	75	107
		GAGT	197	1309	3415	1817	860
		GATA	339	200	131	32	42
		GATC	156	483	1229	764	551
		GATC	253	167	152	293	133
		GATC	450	434	180	389	477
24	IMX2 49	GATG	285	49	40	301	106
		GATT	126	3424	1173	2935	4890
		GATT	214	2246	692	1808	2796
		GCAA	226	173	755	823	572
		GCAA	333	177	41	116	152

10

20

30

40

【 0 2 0 0 】

【 表 1 】

		GCAG	118	337	434	654	1602
		GCAT	242	1111	1093	115	369
62	IMX2 70	GCAT	276	2425	1784	183	770
56	IMX2 71	GCAT	361	261	65	168	476
		GCAT	447	93	73	94	176
		GCCC	444	145	77	228	156
		GCCC	452	162	60	209	149
		GCCG	269	770	28	359	512
33	IMX2 15	GCCG	364	72	120	378	206
34	IMX2 16	GCGA	190	169	539	392	140
		GCTA	82	1049	3530	2007	819
		GCTA	269	1387	490	598	1485
		GCTA	452	41	261	150	42
		GCTC	157	1515	467	659	1151
3	IMX2 17	GCTC	245	258	864	1457	514
57	IMX2 72	GCTC	425	460	67	208	650
		GCTG	160	1171	2011	1804	726
		GGAA	416	1601	1067	553	2083
		GGAC	270	62	231	162	93
		GGAC	327	527	145	409	727
		GGAG	274	309	83	398	472
		GGAG	283	266	67	215	306
		GGAG	440	73	38	73	98
		GGAT	276	1016	639	118	259
		GGAT	362	140	35	55	152
		GGCA	341	155	94	56	168
		GGCA	349	214	63	88	192
		GGCC	170	920	103	257	467
		GGCC	327	86	345	470	87
		GGCT	445	447	79	403	606
		GGGA	430	817	139	777	1212
		GGGC	142	1375	565	529	389
		GGGC	355	288	61	205	271
		GGGC	418	53	44	64	99
		GGGG	241	126	389	812	371
35	IMX2 20	GGGT	150	138	190	461	328
61	IMX2 34	GGGT	177	622	1213	3329	2197
		GGTC	117	1171	2648	2360	1133
		GGTC	374	104	72	295	285
		GGTT	268	73	41	22	129
		GTAG	117	204	331	299	1780
		GTAG	437	57	66	146	118
		GTAT	242	407	356	18	73
17	IMX2 61	GTAT	276	896	608	39	189
		GTAT	362	184	67	106	257
		GTAT	382	132	25	30	121
		GTAT	409	40	32	27	116

10

20

30

40

【 0 2 0 1 】

【 表 1 】

		GTCA	92	555	813	1400	722
		GTGA	88	968	2297	1809	1928
		GTGC	293	565	160	147	541
		GTGC	442	730	204	705	1245
		GTGT	240	31	24	22	160
		GTGT	276	65	59	97	143
		GTTC	167	104	172	323	318
		GTTC	490	35	24	72	33
		GTTT	198	70	86	203	64
		TAAC	92	144	162	500	167
		TAAC	331	122	45	68	63
		TAAC	395	47	52	104	117
		TAAG	143	88	120	335	162
23	IMX2 21	TAAG	192	129	46	92	594
		TAAG	201	59	120	193	150
		TAAG	244	278	118	107	133
		TAAG	266	44	26	37	90
58	IMX2 73	TAAG	302	4180	1203	490	1807
		TAAT	267	59	131	88	178
		TACC	343	54	91	242	49
		TACC	415	206	218	446	439
		TACG	284	1286	411	984	1079
		TACT	160	1169	944	656	533
40	IMX2 35	TACT	338	235	316	850	781
		TAGA	121	329	139	52	157
		TAGC	219	1774	2833	577	4624
44	IMX2 51	TAGG	80	392	2299	2373	469
		TAGG	175	2013	846	314	489
		TAGT	177	858	886	199	141
4	IMX2 22	TAGT	236	261	118	1534	1085
		TATC	314	379	292	115	241
		TATT	268	80	153	112	238
		TCAG	223	3378	931	1638	3793
36	IMX2 23	TCAT	161	314	800	1426	849
		TCAT	176	1442	802	372	371
6	IMX2 36	TCAT	188	99	856	1141	921
		TCCA	312	430	51	267	553
		TCCC	314	468	74	316	519
		TCCG	472	388	54	24	43
		TCCT	176	1100	1002	2127	1547
25	IMX2 62	TCCT	259	618	175	281	347
20	IMX2 74	TCTC	232	1700	164	230	653
37	IMX2 24	TCTC	365	94	118	819	435
		TCTC	392	27	62	199	126
		TCTG	120	907	1918	925	586
		TCTG	154	219	437	813	345
		TCTG	263	138	301	612	292

10

20

30

40

【 0 2 0 2 】

【 表 1 】

		TCTG	381	113	15	17	28
		TCTT	197	396	1276	779	660
		TGAC	175	365	45	54	36
		TGAC	283	340	175	157	71
38	IMX2 25	TGAC	376	9	38	394	448
		TGAC	416	2068	581	787	2274
		TGAT	279	193	129	286	664
19	IMX2 63	TGAT	476	2230	1330	42	139
		TGCA	79	1129	2391	2202	689
		TGCA	124	1783	1512	1373	982
		TGCA	186	203	147	1013	628
		TGCA	217	471	163	66	44
		TGCA	414	35	29	52	120
		TGCC	301	312	267	35	135
39	IMX2 26	TGCC	344	372	598	2223	563
		TGCG	120	186	215	683	581
		TGCG	410	2776	258	1208	2951
		TGCT	89	1267	2754	2523	928
		TGCT	403	61	105	280	208
		TGGA	95	1917	1923	1911	839
		TGGC	80	755	1969	2468	1069
		TGGC	121	185	1280	1415	455
22	IMX2 64	TGGC	175	1747	262	427	73
		TGGC	219	2529	5287	5480	5240
		TGGC	402	185	36	128	104
		TGGT	175	946	288	215	213
5	IMX2 28	TGTA	166	194	554	102	157
		TGTC	154	1177	918	3439	3334
		TGTC	264	5701	4480	1159	2280
45	IMX2 52	TGTC	343	38	26	296	32
		TGTG	266	67	664	294	187
		TGTG	362	1800	943	370	1050
		TTAA	313	140	288	281	340
46	IMX2 53	TTCC	320	29	515	354	109
		TTCC	346	37	255	100	32
		TTCT	267	59	88	98	146
		TTGA	161	161	239	803	467
		TTGC	353	54	92	220	109
		TTGC	383	37	201	573	255
		TTGG	289	139	116	541	324
		TTGT	264	144	264	465	325
		TTTC	149	287	1262	979	147
		TTTT	268	93	150	130	256

【 0 2 0 3 】

【 表 2 】

表 2

表2

Seq ID	クローンID	デジタル アトラス (MspI)	データベース マッパ (登録番号)	相対DST量*	12日	確認方法		
				0日	4日			
59	IMX2_2	AACG 299	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	382	725	705	R	
60	IMX2_3	AATG 114	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57960)	176	191	332	R	
1	IMX2_4	ACAC 320	EST Soares mouse 3NbMS cDNA (AA178128)	669	1306	810	N	
28	IMX2_7	ACTC 171	Mouse monokine induced by gamma interferon (M34815)	79	87	796	R	
30	IMX2_11	AGTC 476	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	207	650	517	R	
33	IMX2_15	GCCG 364	Mouse FVB/N collagen pro-alpha (U08020)	370	667	717	R	
23	IMX2_21	TAAG 192	NOVEL	240	408	866	N	
4	IMX2_22	TAGT 236	Mouse mRNA for serine/threonine kinase (Y09010)	2931	3158	4025	N	
37	IMX2_24	TCTC 365	Mouse EN-7 mRNA (X53247)	117	136	291	N	
38	IMX2_25	TGAC 376	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X03690)	136	103	548	R	
5	IMX2_28	TGTA 166	NOVEL	993	1195	699	N	
21	IMX2_33	CTCC 198	Mouse secretory leukocyte protease inhibitor mRNA (U73001)	82	331	386	R	
6	IMX2_36	TCAT 188	EST Barstead mouse proximal colon MPLRB6 Mus musculus cDNA (AA529850)	106	148	465	N	
42	IMX2_40	CATT 90	EST Mus musculus unfertilized egg (AU023455)	51	216	56	R	
8	IMX2_43	CCAA 272	EST Knowles Solter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone (AA571661)	59	114	61	N	
10	IMX2_46	CGCG 458	EST Soares mouse lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone 750847 (AA290194)	64	53	269	N	
12	IMX2_48	CTCC 386	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein -1 (MIP2) (X53798)	図4を参照				R

EST = Expressed Sequence Tag, NA = Not Applicable, R = Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, N = Northern Blot Analysis *Relative DST Amount = Relative DST Amount for Northern blots have been corrected for background and normalized to the hybridization signal of cyclophilin. The values were obtained by exposing the Northern blot to a phosphorimaging screen and quantitated using the PhosphorImager SI.

【0204】

【表2】

表 2 (つづき)									
Seq ID	クローンID	ディジタル アレイ (MspI)	フィアース マッチ (登録番号)	0 日	相対DST量*			確認方法	
					4 日	8 日	12 日		
13	IMX2_55	CCCG 473	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	194	45	0	7	R	
49	IMX2_60	CTCG 472	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	549	62	11	21	R	
17	IMX2_61	GTAT 276	EST Barstead mouse pooled organs (AA240177)	297	82	401	524	R	
22	IMX2_64	TGGC 175	NOVEL	238	0	0	0	N	
57	IMX2_72	GCTC 425	Homolog to rat G protein gamma-5 Subunit mRNA (M95780)	191	226	155	173	N	
20	IMX2_74	TCCTC 232	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 Mus musculus cDNA clone (AA689792)					R	
図 5 を見よ									

10

20

30

40

50

【0205】

EST = エクスプレスト・シークエンス・タグ；

NA = ノット・アプライカブル；

R = リバース・トランスクリプターゼ・ポリメラーゼ・チェーン反応；

N = ノーザンブロット分析；

* 相対 DST 量 = ノーザンブロット分析の相対 DST 量は、バックグラウンドに対して補正し、そしてシクロフィリンのハイブリダイゼーションシグナルに対して基準化した。数値はノーザンブロットをホスホールイメーシングスクリーンに暴露して得、ホスホールイメージャー SI を用いて定量化した。

【0206】

【表 3】

表 3 (フブモ)

Seq ID	クローニド	ジェンアル アトリス (MspI)	データベース ミツク (登録番号)	% ホモロジー	ヌクレオチド 範囲 (bp#)	データベース 範囲 (bp#)
50	IMX2_1	AAAC 407	Mouse ion channel homolog RIC mRNA (U72680)	99%	1 - 314	475 - 788
59	IMX2_2	AACG 299	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	99%	1 - 248	3456 - 3703
60	IMX2_3	AATG 114	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57960)	96%	1 - 64	545 - 608
1	IMX2_4	ACAC 320	EST Soares mouse 3NbMS cDNA (AA178128)	99%	1 - 264	178 - 441
26	IMX2_5	ACAC 398	Mouse MHC class II protein alpha chain, complete cds (M95514)	98%	1 - 348	653 - 999
27	IMX2_6	ACCT 364	Murine AIDS virus-related provirus (S80082)	99%	1 - 310	2716 - 3025
28	IMX2_7	ACTC 171	Mouse monokine induced by gamma interferon (M34815)	83%	1 - 117	321 - 437
29	IMX2_8	AGCA 285	Mus musculus 45S pre rRNA gene (X82564)	98%	1 - 234	6078 - 6309
30	IMX2_11	AGTC 476	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	97%	1 - 414	4673 - 5087
31	IMX2_12	AGTG 244	Mouse mRNA for serum amyloid (X03479)	100%	1 - 185	236 - 420
32	IMX2_13	ATAC 226	Mus musculus I-kappa B alpha chain mRNA (U36277)	100%	1 - 173	855 - 1027
33	IMX2_15	GCCG 364	Mouse FVB/N collagen pro-alpha (U08020)	99%	1 - 308	3616 - 3923
34	IMX2_16	GCGA 190	EST Mus musculus 8-cell embryo cDNA 3' end sequence (AU020205)	93%	1 - 124	11 - 134
3	IMX2_17	GCTC 245	Mouse CRP-ductin-alpha mRNA (U37438)	98%	1 - 192	2815 - 3006
35	IMX2_20	GGGT 150	Mouse MHC class III H2-C4 complement component (M12969)	98%	1 - 99	31 - 129
23	IMX2_21	TAAG 192	NOVEL	N/A	N/A	N/A
4	IMX2_22	TAGT 236	Mouse mRNA for serine/threonine kinase (Y09010)	100%	1 - 169	2555 - 2723

EST = Expressed Sequence Tag, N/A = Not Applicable

【0207】

【表 3】

表 3 (つづき)

Seq ID	クローンID	制限酵素 (MspI)	データベース (登録番号)	% ホモロジー	ヌクレオチド 配列 (bp#)	ヌクレオチド 配列 (bp#)
36	IMX2_23	TCAT 161	Mouse glycoprotein CD28 mRNA MUSCD28 (M34563)	99%	1-109	1382-1490
37	IMX2_24	TCTC 365	Mouse EN-7 mRNA (X53247)	98%	1-306	919-1222
38	IMX2_25	TGAC 376	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X03690)	99%	1-324	494-817
39	IMX2_26	TGCC 344	Mouse DNA for alpha globin (X05379)	99%	1-291	644-1068
5	IMX2_28	TGTA 166	NOVEL	N/A	N/A	N/A
40	IMX2_35	TACT 338	Stratagene mouse macrophage (#937306) Mus musculus cDNA clone (AA919822)	98%	1-281	61-341
6	IMX2_36	TCAT 188	EST Barstead mouse proximal colon MPLRB6 Mus musculus cDNA (AA529850)	99%	1-133	336-467
41	IMX2_39	ATAA 226	Mouse ceruloplasmin mRNA (U49430)	99%	1-172	558-729
42	IMX2_40	CATT 90	EST Mus Musculus unfertilized egg (AU023455)	100%	1-36	117-152
43	IMX2_42	CCAA 201	EST mouse 4-cell embryo (AU041854)	96%	1-108	1-108
8	IMX2_43	CCAA 272	EST Knowles Solter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone (AA571661)	98%	1-221	282-502
10	IMX2_46	CGCG 458	EST Soares mouse lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone 750847 (AA290194)	99%	1-298	175-471
12	IMX2_48	CTCC 386	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein -1 (MIP2) (X53798)	99%	1-331	65-395
24	IMX2_49	GATG 285	NOVEL	N/A	N/A	N/A
44	IMX2_51	TAGG 80	Stratagene mouse skin (#937313) Mus musculus cDNA clone (A1644131)	100%	1-24	23-46
45	IMX2_52	TGTC 343	Mouse DNA for alpha globin (X05379)	99%	1-291	644-1068
46	IMX2_53	TTCC 320	Mus musculus short incubation prion protein PmPa gene, complete cds (U29186)	99%	1-283	21054-21336
13	IMX2_55	CCCG 473	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	97%	5-414	37-445

【 0 2 0 8 】

【 表 3 】

表 3(つぎ)

Seq ID	クローニング ID	消化酵素 (MspI)	データベース (登録番号)	% ホモロジー	スクリーン DST スクリン 範囲 (bp#)	スクリーン DST スクリン 範囲 (bp#)
15	IMX2_57	CGAT 176	EST Soares mouse NML cDNA (AA244542)	96%	1-125	125-249
47	IMX2_58	CGCG 472	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	96%	8-226	40-258
48	IMX2_59	CGGC 323	EST Soares mouse NML cDNA (AA268434)	99%	13-256	65-308
49	IMX2_60	CTCG 472	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	97%	224-415	255-446
17	IMX2_61	GTAT 276	EST Barstead mouse pooled organs (AA240177)	99%	1-226	277-502
25	IMX2_62	TCCT 259	NOVEL	N/A	N/A	N/A
19	IMX2_63	TGAT 476	EST UI-M-BH3-avd-b-10-0-UIs1 NIH_BMAP_M_S4 Mus musculus cDNA clone (AA495679)	99%	1-427	12-437
22	IMX2_64	TGGC 175	NOVEL	N/A	N/A	N/A
51	IMX2_65	AAAC 186	Mouse mitochondrial genes coding for rRNAs (V00665)	98%	4-141	1451-1588
52	IMX2_66	ACGG 238	Human RNA for RNA polymerase (Z23102)	91%	79-145	1428-1494
53	IMX2_68A	CCGC 266	Mouse mRNA regulated by bone morphogenic protein (X95281)	96%	1-207	652-858
54	IMX2_68B	CCGC 266	Mouse cytochrome beta-558 (M31775)	98%	1-196	468-664
55	IMX2_69	CCGT 151	Mouse beta-galactoside-Binding lectin (M33215)	95%	1-97	524-620
56	IMX2_71	GCAT 361	EST Soares mouse 3NME12 cDNA (AA199089)	99%	1-307	45-350
57	IMX2_72	GCCT 425	Homolog to rat G protein gamma-5 Subunit mRNA (M95780)	95%	1-221	88-308
58	IMX2_73	TAAG 302	EST Soares 2NMT cDNA clone (AA116528)	100%	1-244	281-524
20	IMX2_74	TCTC 232	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 Mus musculus cDNA clone (AA689792)	95%	1-171	175-341

【 0 2 0 9 】

【 表 4 】

10

20

30

40

表 4: 確認された候補マッシュ

Seq ID	クローンID	デジナル アドレス (MspI)	遺伝子正体 (登録番号)	伸長プライマー (SEQ ID NO:)
50	IMX2_1	AAAC 407	Mouse ion channel homolog RIC mRNA (U72680)	GAT CGA ATC CGG AAA CGG GGA CCG CTG GTG (SEQ ID NO:124)
26	IMX2_5	ACAC 398	Mouse MHC class II protein alpha chain, complete cds (M95514)	GAT CGA ATC CGG ACA CCA TAG AGA CCC TGA (SEQ ID NO:85)
27	IMX2_6	ACCT 364	Murine AIDS virus-related provirus (S80082)	GAT CGA ATC CGG ACC TCA CCG ACC AGC CCA (SEQ ID NO:125)
29	IMX2_8	AGCA 285	Mus musculus 45S pre rRNA gene (X82564)	GAT CGA ATC CGG AGC ACC ACA TCG ATC TAA (SEQ ID NO:86)
31	IMX2_12	AGTG 244	Mouse mRNA for serum amyloid (X03479)	GAT CGA ATC CGG AGT GGC AAA GAC CCC AAC (SEQ ID NO:126)
32	IMX2_13	ATAC 226	Mus musculus I-kappa B alpha chain mRNA (U36277)	GAT CGA ATC CGG ATA CAG CAG CAG CTG GGC (SEQ ID NO:69)
34	IMX2_16	GCGA 190	EST Mus musculus 8-cell embryo cDNA 3'-end sequence (AU020205)	GAT CGA ATC CGG GCG ATG GTG GTG TAT GCC (SEQ ID NO:87)
3	IMX2_17	GCTC 245	Mouse CRP-ductin-alpha mRNA (U37438)	GAT CGA ATC CGG GCT CTG GGT CTA TTG TTC (SEQ ID NO:70)
35	IMX2_20	GGGT 150	Mouse MHC class III H2-C4 complement component (M12969)	GAT CGA ATC CGG GGG TGC CAG GTG TGA GGC (SEQ ID NO:71)
36	IMX2_23	TCAT 161	Mouse glycoprotein CD28 mRNA MUSCD28 (M34563)	GAT CGA ATC CGG TCA TGG GAA CTC AGT ATT (SEQ ID NO:72)
39	IMX2_26	TGCC 344	Mouse DNA for alpha globin (X05379)	GAT CGA ATC CGG TGC CCT GTC TGC TCT GAG (SEQ ID NO:73)
21	IMX2_33	CTCC 198	Mouse secretory leukocyte protease inhibitor mRNA (U73004)	GAT CGA ATC CGG CTC CCT GTA TCC CAG GCT (SEQ ID NO:74)
61	IMX2_34	GGGT 177	Mouse MHC sex-linked protein (M21576)	GAT CGA ATC CGG GGG TGC CAG GTG TGAGGC (SEQ ID NO:75)
40	IMX2_35	TACT 338	Stratagene mouse macrophage (#937306) Mus musculus cDNA clone (AA919822)	GAT CGA ATC CGG TAC TGG GGA GGC ACA GGC (SEQ ID NO:88)
41	IMX2_39	ATAA 226	Mouse ceruloplasmin mRNA (U49430)	GAT CGA ATC CGG ATA ACA GTA TGT GTA TGT (SEQ ID NO:76)
43	IMX2_42	CCAA 201	EST mouse 4-cell embryo (AU041854)	GAT CGA ATC CGG CCA AAC TCT CAA TTA CCA (SEQ ID NO:77)

EST = Expressed Sequence Tag

【 0 2 1 0 】

【 表 4 】

10

20

30

40

表 4(7abaki): 確認された候補マツチ

Seq ID	クローン ID	デジタルアドレス (MspI)	遺伝子正体 (登録番号)	伸長プライマー (SEQ ID NO:)
10	IMX2_46	CGCG 458	EST Soares mouse lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone 750847 (AA290194)	GAT CGA ATC CGG CGC GCA CGG GGA CCA GAC (SEQ ID NO:78)
24	IMX2_49	GATG 285	NOVEL	GAT CGA ATC CGG GAT GTG GGA AGG TTA GAA (SEQ ID NO:89)
44	IMX2_51	TAGG 80	Stratagene mouse skin (#937313) Mus musculus cDNA clone (A1644131)	GAT CGA ATC CGG TAG GGT AGA GTG TCG CCA (SEQ ID NO:90)
45	IMX2_52	TGTC 343	Mouse DNA for alpha globin (X05379)	GAT CGA ATC CGG TGT CCT GTC TGC TCT GAG (SEQ ID NO:79)
46	IMX2_53	TTCC 320	Mus musculus short incubation prion Protein PrnPa gene, complete cds (U29186)	GAT CGA ATC CGG TTC CCA TAT CTT TGA GGG (SEQ ID NO:91)
15	IMX2_57	CGAT 176	EST Soares mouse NML cDNA (AA244542)	GAT CGA ATC CGG CGA TGT ACA CTC GGG TCA (SEQ ID NO:92)
47	IMX2_58	CGCG 472	EST Barsicad mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	GAT CGA ATC CGG CGC GTA TCT GTG TGA ACT (SEQ ID NO:93)
48	IMX2_59	CGCG 323	EST Soares mouse NML cDNA (AA268434)	GAT CGA ATC CGG CGG CGA TAT CCA GTC TGG (SEQ ID NO:94)
25	IMX2_62	TCCT 259	NOVEL	GAT CGA ATC CGG TCC TGG CAG ACA GAC ATG (SEQ ID NO:95)
19	IMX2_63	TGAT 476	EST UI-M-BH3-avd-b-10-0-UIs1 NIH BMAP M. S4 Mus musculus cDNA clone (AW495679)	GAT CGA ATC CGG TGA TAA GAG CAA CTT CGC (SEQ ID NO:96)
51	IMX2_65	AAAC 186	Mouse mitochondrial genes Coding for tRNAs (V00665)	GAT CGA ATC CGG AAA CCC CGA AAC CAA ACG (SEQ ID NO:80)
52	IMX2_66	ACGG 238	Human RNA for RNA polymerase (Z23102)	GAT CGA ATC CGG ACG GAG GAC CAC CCG TGC (SEQ ID NO:81)
53	IMX2_68A	CCGC 266	Mouse mRNA regulated by bone morphogenic protein (X95281)	GAT CGA ATC CGG CGC CCA CCC AAC AAC TTT (SEQ ID NO:97)
54	IMX2_68B	CCGC 266	Mouse cytochrome beta-558 (M31775)	GAT CGA ATC CGG CGG CCC GCA GAG GTC CGA (SEQ ID NO:98)
55	IMX2_69	CCGT 151	Mouse beta-galactoside-Binding Lecin (M33215)	GAT CGA ATC CGG CCG TGT GTG CCG TAG GAG (SEQ ID NO:82)
62	IMX2_70	GCAT 276	Mouse mRNA for preproelastase II (X04573)	GAT CGA ATC CGG GCA TCT AAT GGC CAG TGG (SEQ ID NO:83)
56	IMX2_71	GCAT 361	EST Soares mouse 3NMEI2 cDNA (AA199089)	GAT CGA ATC CGG GCA TCC ATG GGT TCC AAC (SEQ ID NO:84)
58	IMX2_73	TAAG 302	EST Soares 2NbMT cDNA clone (AA116528)	GAT CGA ATC CGG TAA GCA TGG CAA GAC CCG (SEQ ID NO:99)

EST = Expressed Sequence Tag

10

20

30

40

【0211】

EST = エクспレスト・シーケンス・タグ

【0212】

【表5】

TABLE 5: RT-PCR 確認プライマー

Seq ID	クローンID	プライマー (MSP1)	プライマー (MSP1)	プライマー (MSP1)
59	IMX2_2	AACG 299	5' RT-PCR プライマー 864	3' RT-PCR プライマー
60	IMX2_3	AATG 114	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	CACAGCCTTC GTCTCATCG CACTG (SEQ ID NO:100) TTG TTCATCA GGGCCAGGGC ATACC (SEQ ID NO:101) TCTGAAGCCC CGTGCTCCAC CCACT (SEQ ID NO:102) TCACGGCCCC GCTCCCATTC C (SEQ ID NO:103)
28	IMX2_7	ACTC 171	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57960)	CCAAAGTCCCA GGCCTGTCTG TT (SEQ ID NO:104) TGCTCTCCAC TGTAGAACC CCAAAA (SEQ ID NO:105)
30	IMX2_11	AGTC 476	Mouse monokine induced by gamma interferon (M34815)	ACATAGAGCT GTTGGATGAT TTGA (SEQ ID NO:106) CAAGTCTTC GCACTGTTTC TGGA (SEQ ID NO:107)
33	IMX2_15	GCCG 364	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	CGACCTCAAG ATGTGCCACT CTGA (SEQ ID NO:108) ACCACTTCTT CTGAGGCCACA GACGG (SEQ ID NO:109)
38	IMX2_25	TGAC 376	Mouse FVB/N collagen pro-alpha (U08020)	GAAACAAAGGA TCCACACCCC AAACC (SEQ ID NO:110) GCACATGTGG AGGACACGTT CTTC (SEQ ID NO:111)
21	IMX2_33	CTCC 198	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X03690)	CAGTGTGGAG GAAAGCTGGG AGGTG (SEQ ID NO:127) CACATCGGGG GCAGGCAGAC TTTC (SEQ ID NO:128)
42	IMX2_40	CATT 90	Mouse secretory leukocyte protease inhibitor mRNA (U73004)	ATGAAAATA TGGAAATGA TAAA (SEQ ID NO:112) CTAAAATGTT CTACAGTGTG GTTT (SEQ ID NO:113)
12	IMX2_48	CTCC 386	EST Mus musculus unfertilized egg (AU023455)	GCCCAGACAG AAGTCATAGC CACTC (SEQ ID NO:114) TTTATGGTTC TTCCGTTGAG GGACA (SEQ ID NO:115)
13	IMX2_55	CCCG 473	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein -1 (MIP2) (X53798)	GAGTCTGGCT CTGGGATTGC AGAA (SEQ ID NO:116) CCCCCATAGG AATCCTGCTC TTGT (SEQ ID NO:117)
49	IMX2_60	CTCG 472	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	CCACTGGGGA GGAAGGCTT GAA (SEQ ID NO:118) CCACATGGTC CCACAAGGAA ACATC (SEQ ID NO:119)
17	IMX2_61	GTAT 276	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 (AA823573)	GCAGGTGCAT GGCATCGTGA (SEQ ID NO:120) GGGGACAGTG GCAGTAATGT CTTC (SEQ ID NO:121)
20	IMX2_74	TCTC 232	EST Barstead mouse irradiated colon MPLRB7 Mus musculus cDNA clone (AA689792)	TCAGAGATTA GCATGGTGGG ACA (SEQ ID NO:122) CTGGTTTGAC AGAGACGCAG TAGTC (SEQ ID NO:123)

10

20

30

40

50

【0213】

実施例 2

RT-PCR バリデーション

クローン化したDSTのRT-PCRバリデーションを実施し、結果を表2に示す。テンプレートの開始量を、所定のクローン化したDSTの増幅の直線範囲を正確に定義するために作成した対照曲線に基づいて選択した。TOGA^{T M} パネルからクローン化したピークの強度に基づいて、以下の量のテンプレートを選択した。

TOGA ピーク強度	低 [cDNA]	高 [cDNA]
0-400	2000 pg	5000 pg

300-1000	400 pg	2000 pg
>1000	50 pg	250 pg

クローン化したDSTのバリデーションで用いたPCRプライマーを表5に列挙する。最も強いTOGATM信号を示すタイムポイントサンプルから選択した適当な低濃度及び高濃度のcDNAテンプレートをを用いて、重複反応混合物をアSEMBルした。反応混合物を、23、26、29、32、35及び38のサイクルで反復した。重複反応から得た増幅産物を定量化し、サイクル数に対してプロット化して、標準曲線を作成した。これらデータから、様々なタイムポイント全体のPT-PCRバリデーションのために、増幅の直線範囲内で許容可能なレベルのPCR産物を産生したサイクル数とcDNA濃度を選択した。

10

【0214】

RT-PCRバリデーションは、定義したサイクル数で反復される選択的な濃度のcDNAを用いて三重複反応をアSEMBルする工程からなる。例えば、表2でIMX2-55 (SEQ ID NO: 13) のデータは、50 pgのcDNAテンプレートと29サイクルを用いて得られた。同じ条件下で内部対照プライマー対も増幅を行って、cDNAテンプレート間の相違を正規化するための根拠を求めた。

【0215】

実施例3

蛍光分析を用いたRT-PCR解析

2つのDSTを代替プロトコルを用いてバリデーションした。RT-PCRに用いたプライマーを表5に列挙する。検証した各DSTについて、予備実験から得た結果に基づいた対応するセットのプライマー（表5を参照）について、最適なアニーリング温度と試薬の条件を決定した。8回の個別の反応において、プライマーの濃度、dNTPの濃度、MgCl₂の濃度、及びTaqポリメラーゼの4つのパラメータを調整して、各プライマーのセットを検定して最適な条件を見つけた。一旦最適な条件が決定されれば、各DSTを、通常テンプレートの少なくとも4つの希釈が含まれる重複の複数同時反応と、テンプレートのない対照反応、サイクル数の6連続データ点で行った。

20

【0216】

Clontech TaqStart抗体システム（カタログ番号5400-1）で「温態開始」PCRを用いて反応を行った。各反応にはテンプレートとして1 µlのcDNAライブラリー希釈、決定した量のAmpliTaq DNAポリメラーゼ（カタログ番号808-0156）、MgCl₂、dNTP（GibcoBRL カタログ番号10297-018）、プライマー、Clontech TaqStart抗体を、10% Taq緩衝剤（MgCl₂含まず）を用いた20 µlの反応量に入れた。典型的には、テンプレート以外すべての成分を含有するマスターミックスを調製して、アリコートした。次に様々なテンプレートをこれらマスターミックスのサンプルに添加し、さらに個々の反応管に20 µlの量を調合した。PCRの実行中、サイクルの「窓」を超える標的DSTの発現を定量化するために、予め決めたスケジュールに従って次々に管を除去した。増幅後、サンプルを蛍光分析で定量化した。

30

【0217】

PCRは、次のプログラムに従って各プライマー対の最低溶解温度よりも約5度高いアニーリング温度で実施した。1) 摂氏95度、3分、2) 摂氏95度、30秒、3) TM+摂氏5度、30秒、4) 摂氏72度、16 bp/秒で標的の長さに従った時間、5) 2~4の工程を33サイクル以上繰り返す、6) 摂氏72度、3分、7) 摂氏14度、繰返し。

40

【0218】

温度循環した後、96ウェルのCoster UVマイクロタイタープレート（Fisherカタログ番号07-200623）でTE pH7.5の140 µlの1:280の希釈のPicoGreen（Molecular Probesカタログ番号p-11495（10×100ミクロンl））に、2 µlのPCR反応を加えた。このサンプルを1.

50

5 分間ゆっくりと混合して、15 分間暗所で室温で平衡状態にさせた。PCR 産物の濃度を、PerSeptive Biosystems CytoFluor シリーズ 4000 マルチウェルプレートリーダーを用いた蛍光分析により定量化した。

【0219】

バックグラウンド蛍光を、テンプレート以外のすべての反応成分で反復した重複対照サンプルを用いて決定した。これら重複バックグラウンド対照サンプルからの平均値を、分析結果前の対応する実験値から減じた。PicoGreen dsDNA 検定の感度は、これら測定で使用したような蛍光マイクロプレートリーダーを用いて 250 pg/ml (200 μ l の検定量中に 50 pg dsDNA) と報告されている。

【0220】

1 : 2000 のライブラリーの希釈について定量化した IMX2 - 48 の RT-PCR の結果を、図 4 (任意蛍光単位で) と表 6 (各タイムポイントで対照値に正規化した) に示す。1 : 500 のライブラリーの希釈について定量化した IMX2 - 74 の RT-PCR の結果を、図 5 (任意蛍光単位で) と表 6 (各タイムポイントで対照値に正規化した) に示す。

【0221】

【表 6】

表 6										
サイクル	IMX2 48				cycle	IMX2 74				
	1:2000 0d	1:2000 4d	1:2000 8d	1:2000 12d		1:500 0d	1:500 4d	1:500 8d	1:500 12d	
24	1.0	0.9	1.0	1.0						
26	1.0	2.4	2.0	1.4	26	1.00	0.17	0.12	0.38	
28	1.0	3.3	3.4	3.4						
					29	1.00	0.25	0.33	0.44	
30	1.0	4.5	6.7	6.1						
32	1.0	3.9	10.2	11.3	32	1.00	0.60	0.56	0.70	
34	1.0	15.5	36.0	36.5						
TOGA	1.0	1.6	7.3	2.8	TOGA	1.00	0.10	0.14	0.38	

【0222】

【表 7】

表 7
伸長配列の関係

Seq ID	伸長配列 ID	伸長配列の対照配列 (bp #)	データベースミッチ (登録番号)	%ホモロジー	伸長配列のヌクレオチド範囲 (bp #)	データベースのヌクレオチド範囲 (bp #)
2	IMX2_4.EX _T	688 - 957	Homology to Homo sapiens chromosome 19, cosmid R27656, complete sequence (AC007565.1)	76% 71% 73% 83% 79% 62% 59% 75% 67% 69% 62% 75% 77%	2 - 97 53 - 200 214 - 282 255 - 297 297 - 450 529 - 646 714 - 887 792 - 852 792 - 871 792 - 891 796 - 916 884 - 935 884 - 935	7692 - 7785 15459 - 15618 19159 - 19225 22411 - 22453 28497 - 28651 28700 - 28820 8337 - 8515 41775 - 41835 16338 - 16414 39753 - 39848 36657 - 36785 18855 - 18907 25677 - 25729
7	IMX2_36.EX _T	293 - 427	Mus musculus DAPI2 mRNA, complete cds (AF024637.1) Mus musculus KAR-associated protein mRNA, complete cds (AF077829.1)	100% 100%	1 - 254 1 - 254	92 - 345 92 - 345
9	IMX2_43.EX _T	1097 - 1298	Homology not determined			
11	IMX2_46.EX _T	157 - 561	Homology to Homo sapiens regulator of Fas-induced apoptosis (TOSO) mRNA (NM_005449.1)	74%	113 - 370	913 - 1170

【 0 2 2 3 】

【 表 7 】

10

20

30

40

表 7. フグき

Seq ID	伸長配列 ID	伸長配列に 対する DSS プライマー (bp #)	テラーゲンス マウス (登録番号)	% ホモジ-	伸長配列の ヌクレオチド範囲 (bp #)	テラーゲンス ヌクレオチド範囲 (bp #)
14	IMX2_55.EX T	332 - 744	Homology to R. norvegicus C-reactive protein mRNA, complete cds. (M83176.1) Murine mRNA for C-reactive protein (CRP) (X17496.1) Mus musculus C-reactive protein, petaxin related (Cp), mRNA (NM_007768.1)	65% 56% 62% 56% 62%	119 - 253 303 - 567 4 - 118 194 - 567 4 - 118 194 - 567	115 - 253 299 - 563 80 - 194 277 - 650 80 - 194 277 - 650
16	IMX2_57.EX T	283 - 408	Homology to H. sapiens mRNA for chymotrypsin-like protease CTRL-1 (X71877.1) Homology to Homo sapiens chymotrypsin-like (CTRL) mRNA (NM_001907.1) Homology to H. sapiens genes for proteasome-like subunit (MECL-1), chymotrypsin-like protease (CTRL-1) and protein serine kinase (PSK-H1) last exon	84% 84% 83% 83% 84%	7 - 363 7 - 363 7 - 55 52 - 187 179 - 363	464 - 820 464 - 820 8641 - 8689 8773 - 8908 8990 - 9174
18	IMX2_61.EX T	204 - 425	Homology not determined			

10

20

30

40

50

【0224】

実施例 4

IMX2-4 の伸長配列クローン

Edge Biosystems の Cloncapture 手順を用いて、D4/D8 DSS 結腸ライブラリーからクローンを分離した。ライブラリーは、ImmuneX 社の Edge Biosystems により、DSS 治療した C57BL/6 マウスの D4 及び D8 の炎症性結腸から分離した RNA から構成した。クローンは Edg ベクター pEAK12 にある。

【0225】

IMX2_04 DST (SEQ ID NO: 1) は塩基 688 から 957 (SEQ ID NO: 2) まで IMX2_04 の伸長配列と対応している (上記表 7 を参照)。部分的に遺伝子産物をコード化できる塩基 1 で始まるオープンリーディングフレームがある。コード化された部分的な蛋白のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 129 に与えられる。

【0226】

伸長配列を NCBI nr データベース w/BLAST と比較したとき、塩基 1-936 のヌクレオチド配列の直線セグメントが、ヒト染色体 19、AC007565.1 から得たコスミドクローンのヌクレオチド配列のセグメントと約 70% 同一であることを示した (上記表 7 を参照)。このことは、ヒトの IMX2_4 の相同体は、少なくとも部分的には、コスミドで発見されるということを表す。しかし、コスミドで予測されるいくつかのエキソン (GRAIL プログラム又はマウス EST へのある程度の相同性により) は IMX2_4-E10. seq の直線配列によりスキップされる。スキップされるエキソンを除いて予測されるものが、DERWENT データベースで完全な対応が見られる現実であると思われる。Derwent 登録は、コスミドで発見されないアミノ酸配列を含む 1 個のペプチドである Derwent 蛋白登録 (又はヌクレオチド Derwent 登録) に蛋白のフラグメントをもつ「分泌性」分子のためである。しかし、Derwent ヌクレオチド登録も、75% の同一レベルで IMX2_4-E10. seq の 5 末端との対応を示すコスミドのさらに別の 5 セグメントとの対応ももつ。これら様式が分泌性蛋白の様々なスプライス変異体を表すことがある。

10

20

【0227】

実施例 5

IMX2_36 の伸長配列クローン

IMX2_36. EXT 配列情報を、IMAGE コンソーシアムから入手した FVB/N マウスの最も近い結腸由来の EST クローンであるクローン IMX2_36 pT7T3-2. seq から導いた。EST の登録番号は AA529850 で、クローン ID は IMAGE: 921608 である。EST は pT7T3 ベクターにある。IMX2_36 DST (SEQ ID NO: 6) は、塩基 293 から 427 まで IMX2_36. EXT (SEQ ID NO: 7) の伸長配列に対応する (上記表 7 を参照)。EST を GenBank で検索すると、「マウス KAR (キラー活性受容体)」と「DAP12 蛋白」にヒットする (上記表 7 を参照)。

30

実施例 6

IMX2_43 の伸長配列クローン

Edge Biosystems の Clone capture 手順を用いて、クローンを D4/D8 DSS 結腸ライブラリーから分離した。ライブラリーは、ImmuneX 社の Edge Biosystems により、DSS 治療した C57BL/6 マウスからプールされる D4 及び D8 炎症性結腸から分離した RNA から構成した。クローンは Edg ベクター pEAK12 にある。IMX2_43 DST (SEQ ID NO: 8) は、塩基 1079 から 1298 まで IMX2_43 伸長配列 (SEQ ID NO: 9) に対応する (上記表 7 を参照)。

40

【0228】

実施例 7

IMX2_46 の伸長配列クローン

IMX2_46. EXT 配列情報を、IMAGE コンソーシアムから入手した pT7T3 ベクターの EST クローンである IMX2_46 pT7T3-6. seq と IMX2_46 pT7T3-7. seq の 2 つのクローンから導いた。IMX2_46 pT7T3-6. seq (登録番号 AA290194、クローン ID IMAGE: 750847) は C57BL/6 マウスのリンパ節由来であった。IMX2_46 pT7T3-7. seq (登録番号 AA174968、クローン ID IMAGE: 617717) は C57BL/6 マウスの脾臓由来であった。IMX2_46 DST (SEQ ID NO: 10

50

）は、塩基157から561までIMX2-46. EXTの伸長配列(SEQ ID NO: 11)と並んでいる(上記表7を参照)。

【0229】

ESTをGenBankで検索すると、ヒトTOSO: fas誘導アポトーシスの調節因子にヒットする(上記表7を参照)。

実施例8

IMX2-55の伸長配列クローン

IMX2-55. EXT伸張配列情報を、IMAGEコンソーシアムから入手したESTクローンであるIMX2-55 pT7T3-8. seqとIMX2-55 pT7T3-24. seqの2つの結腸から導いた。IMX2-55 pT7T3-8. seq (登録番号AA823573、クローンID IMAGE: 1079189)はFVB照射したマウスの結腸由来であった。IMX2-55 pT7T3-24. seq (登録番号AA690372、クローンID IMAGE: 1164692)はFVBマウスの最も近い結腸由来であった。

10

【0230】

IMX2-55 pT7T3-8. seqのESTの登録番号はAA823573で、クローンIDはIMAGE: 1079189である。IMX2-55 pT7T3-24. seqのESTの登録番号はAA690372で、クローンIDはIMAGE: 1164692である。両ESTともにpT7T3ベクターにあり、IMAGEコンソーシアムから入手した。IMX2-55 pT7T3-8. seqクローンはFVB照射したマウスの結腸由来であり、IMX2-55 pT7T3-24. seqクローンはFVBマウスの最も近い結腸由来であった。IMX2-55 DST(SEQ ID NO: 13)は、322から744までの塩基を伸長配列IMX2-55. EXT(SEQ ID NO: 14)と並んでいる(上記表7を参照)。

20

【0231】

伸長したIMX2-55配列をGenBankで検索すると、C反応性蛋白に相同性をもつESTが明らかになる。

実施例9

IMX2-57の伸長配列クローン

PCRプライマーを、市販されていない2つのESTクローンの配列から得た配列情報に基づいたIMX2-57のためにデザインした。由来する配列情報に用いるESTクローンは、(1)マウスの肝臓由来の登録番号AA240177でクローンID IMAGE: 679264であるESTと、(2)C57BL/6脾臓由来の登録番号AV005227でクローンIDが0910001G08であるESTであった。

30

【0232】

用いるプライマーはDSTとEST AV005227を電子的にアセンブルすることから得た配列を伸長したフォワードプライマーIMX2-57-FPとリバースプライマーIMX2-57-RPであった。C57BL/6マウスの結腸から調製したRNA由来のcDNAで、PCR反応を実施した。PCR産物をpGEMベクターにクローン化して、クローンIMX2-57 PCR1を得た。IMX2-57 DST(SEQ ID NO: 15)は、伸長配列IMX2-57. EXT(SEQ ID NO: 16)の塩基283から408までと並んでいる(上記表7を参照)。

40

【0233】

アセンブルされたESTをGenBankで検索すると、「ヒトキモトリプシン様(CTRL)mRNA」と「ヒトプロテオゾーム様サブユニット(MECL-1)、キモトリプシン様プロテアーゼ(CTRL-1)及びプロテイン-セリンキナーゼ(PSK-H1)の最後のエキソンにヒットする(上記表7を参照)。

【0234】

実施例10

IMX2-61の伸長配列クローン

50

IMX2-61伸長配列情報を、IMAGEコンソーシアムから入手したESTクローンである、ESTクローンIMX2-61pBS-47.seqから導いた。IMX2-61pBS-47.seqのESTの登録番号はAA981092で、クローンIDはIMAGE:1279287である。IMX2-61pBS-47.seqクローンはWEHI3マウスの大食細胞由来であった。IMX2-61DST(SEQ ID NO:17)は、IMX2-61伸長配列(SEQ ID NO:18)の塩基204から425まで並んでいる(上記表7を参照)。

【0235】

実施例11

IMX2-17の伸長配列クローン

10

陰窩ductinアルファスカベンジャー受容体(CRP-ductin)

TOGA分析で、IMX2-17(SEQ ID NO:3)はハツカネズミのCRP-ductin-アルファmRNA、登録番号U37438に対応することが分かった(表3)。CRP-ductinは、小腸の陰窩細胞の先端部分に局在する。結腸では、主に表面の上皮細胞(EC)に見られる。また、ECの内臓管と大きな肝管の先端部分にも見られる。CRP-ductin-アルファ配列は、多くの反復からなる短い細胞質領域、膜貫通領域、及び大きな細胞外領域をもつモザイク蛋白を予測する。細胞外領域には、蛋白のC末端半分の21潜在N糖化部位を含む。また細胞質ドメインにも2つの潜在リン酸化部位がある。

フォワードプライマーmCRP. 5179-FPとリバースプライマーmCRP. 6106-RPを用いて、C57BL/6結腸から分離したRNA由来のcDNAテンプレートから得た936bpの産物をPCRした。PCR産物をpGEMベクターにサブクローン化して、ノザンプロット分析のプロープとして使用する前に配列を検証した。

20

【0236】

図6には、クローンIMX2-17、SEQ ID NO:3のノザンプロット分析の結果を表しているが、ここでは実験サンプルのポリA豊富なmRNAを含み標準サイズのアガロースゲルを電気泳動後にプロット化し、U37438塩基5179-6106に対応する標識プロープで精査し、ホスフォイメジャーを用いて撮像して、定量化した。図6Aには、治療から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス、治療から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のC57BL/6マウスから得た結果と、FVB、大腸炎のないmdrノックアウトマウス、大腸炎のあるmdrノックアウトマウスそれぞれの大腸からのサンプルを示す。図6Bには、治療後0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のBalb/cマウス、0%、5%及び8%DSSで治療したBalb/cマウス、治療後0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のBalb/cマウスから得た結果を示す。IMX2-17CRP-ductinの予測転写サイズは6.6Kbである。本研究で分かった実際の転写サイズは約6.5Kbであった。

30

【0237】

IBDのいくつかのモデルから得たmRNAサンプルにノザンプロットを行った。DSS大腸炎があるC57BL/6マウスから得たサンプルの分析では、最初のTOGA分析の結果(表1)と一致して、大腸で高レベルの構成的な発現を示し、8日でDSS大腸炎は最大となった(図6A)。DSS大腸炎のあるBalb/cマウスから得たサンプルの分析は類似の結果を示した(図6B)。

40

【0238】

αCD3回腸炎をもつC57BL/6マウスから得たサンプルの分析では、小腸で低レベルの構成的な発現を示し、早期に炎症は増大し(図6A)、6時間後に最大に達した後、低下している。αCD3回腸炎をもつBalb/cマウスから得たサンプルの分析では、強度は低かったが、類似の結果を示した(図6B)。

【0239】

構成的な発現が、FVB大腸のサンプルで見られた(図6A)。大腸炎の徴候のない健康なmdrノックアウトマウスでの発現は多く、活性大腸炎をもつmdrノックアウトマウス

50

スでの発現はほとんど増加しなかった（図 6 A）。

【0240】

図 6 のノザンブロットで示された発現を定量化して、各列で G 3 P D H の量に正規化した。正規化した結果を以下の表 8 に示す。

【0241】

【表 8】

表 8 (図 6 の定量化値)		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	27740	11455
Day 4	30853	21103
Day 8	43857	28838
Day 12	22622	26248
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	11832
5 %	Not Done	21278
8 %	Not Done	12717
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	2519	2491
6 Hours	14088	7870
30 Hours	11144	1287
72 Hours	9000	2238
構成的発現		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
14427	29166	15988

10

20

【0242】

実施例 12

IMX2-22 の伸長配列クローン

IMX2-22 の造血幹細胞キナーゼ HPK1

TOGA 分析では、IMX2-22 は、セリン／スレオニンキナーゼのハツカネズミの mRNA、登録番号 Y09010 に対応することが分かった（表 3）。HPK1 は SAPK / JNK 経路を活性化する造血プロテインキナーゼである。 30

フォワードプライマー mHPK1. 1640-FP とリバースプライマー mHPK1. 2420-RP を用いて、C57BL/6 結腸から分離した RNA 由来の cDNA テンプレートから得た 780 bp の産物を PCR した。PCR 産物を pGEN にサブクローン化して、ノザンブロット分析のプローブとして使用する前に配列検証した。IMX2-22 HPK1 の予測転写サイズは 2.7 Kb で、公表されている転写サイズは 2.8 Kb と 3.6 Kb である。本研究で分かった実際の転写サイズは 2.8 Kb であった。

【0243】

図 7 には、クローン IMX2-22、SEQ ID NO: 4 のノザンブロット分析の結果を表す。ここでは、実験サンプルとサイズ標準から得たポリ A 豊富な mRNA を含むアガロースゲルを電気泳動後ブロット化し、Y09010 の塩基 1640 から 2420 に対応する標識プローブとして精査し、phosphorimager を使用して撮像して定量化した。図 7 A には、治療から 0、4、8 又は 12 日後の DSS 大腸炎の C57BL/6 マウス、治療から 0、6、30 又は 72 時間後の αCD3 回腸炎の C57BL/6 マウスからの結果と、大腸炎のない FVB、mdr ノックアウトマウス、大腸炎のある mdr ノックアウトマウス、及び C57BL/6 の脾臓から得た大腸からのサンプルを示す。図 7 B には、治療から 0、4、8 又は 12 日後の DSS 大腸炎の Balb/c マウス、治療から 0、6、30 又は 72 時間後の αCD3 回腸炎の Balb/c マウスからの結果と、C57BL/6 の正常なリンパ組織のサンプル（MLM、PP、脾臓、及び胸腺）を示す。 40 50

【0244】

IBDのいくつかのモデルから得たmRNAサンプルにノザンブロットを実施した。DSS大腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、最初のTOGA分析の結果(表1)とほとんど一致せず、大腸で低レベルの構成的な発現を示し、DSS大腸炎は12日目に最大となることが分かった(図7A)。DSS大腸炎のあるBALB/cから得たサンプルを分析すると、8日目に最大となって、類似の結果を示した(図7B)。

【0245】

αCD3回腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、小腸で構成的な発現を示したが、6時間で低下した(図7A)。αCD3回腸炎のあるBALB/cマウスから得たサンプルを分析すると類似の結果を示した(図7B)。

【0246】

対応するTOGA分析ではほとんど変化がなかったのに対し(データは図示せず)、活性大腸炎をもつmdrノックアウトマウスでの発現は増加した(図7A)。

【0247】

MLN、PP、胸腺のリンパ組織、特に脾臓では、強力な発現が見られた(図7A & B)。

図7のノザンブロットで示された発現を定量化して、各列のG3PDHの量に正規化した。正規化した結果を以下の表9に示す。

【0248】

【表9】

Table 9 表9 (図7の定量値)		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	-50	271
Day 4	64	143
Day 8	82	502
Day 12	419	341
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	614	369
6 Hours	133	47
30 Hours	465	341
72 Hours	168	149
構成的発現		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
59	146	739
正常組織		
MLN	PP	脾臓
10008	4883	33260
		胸腺
		8826

【0249】

実施例13

IMX2-28の伸長配列クローン

ダウンレギュレーションしたアデノーマ蛋白(DRA)

TOGA分析では、IMX2-28がハツカネズミのダウンレギュレーションしたアデノーマ蛋白、登録番号AF136751に対応することが分かった(表3)。

【0250】

フォワードプライマー Dra. 1551-FPとリバースプライマー Dra. 2390-RPを用いて、C57BL/6クローンから分離したRNA由来のcDNAテンプレートから得た840bpの産物をPCRした。PCR産物をpGEMにベクターにサブクローンして、ノザンブロット分析のプローブとして使用する前に配列を検証した。IMX2-

28 DRAの予測転写サイズは2.6 Kbである。本研究で分かった実際の転写サイズは約3 Kbであった。

【0251】

図8には、クローンIMX2-28、SEQ ID NO:5のノザンブロット分析の結果を表す。ここでは、実験サンプルとサイズ標準から得たポリA豊富なmRNAを含むアガロースゲルを電気泳動後にブロット化し、AF136751の塩基1551から2390に対応する標識プローブを精査して、ホスフォイメージャーを用いて撮像して定量化した。図8Aには、治療から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス、治療から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のC57BL/6マウスからの結果と、FVB、大腸炎のないmdrノックアウトマウス、大腸炎のあるmdrノックアウトマウスから得た大腸からのサンプルを示す。図8Bには、治療から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のBalb/cマウス、0%、5%及び8%DSSで治療したBalb/cマウス、及び治療から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のBalb/cマウスからの結果を示す。 10

【0252】

IBDのいくつかのモデルから得たmRNAサンプルにノザンブロットを実施した。DSS大腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、最初のTOGA分析の結果(表1)と一致して、大腸で高レベルの構成的な発現を示したが、炎症とともに低下して、DSS大腸炎は8日目に最低となることが分かった(図8A)。DSS大腸炎のあるBalb/cマウスから得たサンプルを分析すると、同じパターンを示した(図8B)。 20

【0253】

αCD3回腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、DSS大腸炎について大腸で見られたものよりも、小腸で構成的な発現のレベルは低いことが分かった。6時間までに炎症とともに発現は急速に低下し、その後低いままであった(図8A)。αCD3回腸炎のあるBalb/cマウスから得たサンプルを分析すると同じパターンを示した(図8B)。このモデルのTOGA分析(データは図示せず)では、対応するピークは示さなかった。

【0254】

FVB大腸のサンプルで構成的な発現が見られた(図8A)。大腸炎の徴候のない健康なmdrノックアウトマウスでは構成的な発現が見られず、活性大腸炎のあるmdrノックアウトマウスでは発現が劇的に低下した(図8A)。このモデルのTOGA分析(データは図示せず)では、対応するピークを示さなかった。 30

【0255】

図8のノザンブロットで示された発現を定量化して、各列のG3PDHの量に正規化した。正規化した結果を以下の表10に示す。

【0256】

【表10】

Table 10 表10 (図8の定量値)		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	25541	34441
Day 4	20316	35270
Day 8	7569	22711
Day 12	10218	22481
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	22463
5 %	Not Done	19861
8 %	Not Done	17548
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	5937	3534
6 Hours	2211	1275
30 Hours	2192	2051
72 Hours	5300	4142
構成的発現		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
55232	28854	5046

10

【0257】

20

実施例14

IMX2-33の伸長配列クローン

分泌性白血球プロテアーゼ抑制因子 (SLPT)

TOGA分析では、IMX2-33がハツカネズミの分泌性白血球プロテアーゼ抑制因子、登録番号U73004に対応することが分かった(表3)。分泌性白血球プロテアーゼ抑制因子は、白血球セリンプロテアーゼの上皮細胞と大食細胞由来の抑制因子である。SLPIの発現はガンマーIFNにより抑制され、SLPIはLPS反応を抑制する働きをするLPS誘導のガンマーIFN抑制可能な食細胞産物である。

【0258】

フォワードプライマーmSLPI, 447-FPとリバースプライマーmSLPI, 800-RPを用いて、C57BL/6クローンから分離したRNA由来のcDNAテンプレートから得た350bpの産物をPCRした。PCR産物をpGEMベクターにサブクローニングして、ノザンブロット分析のプロープとして使用する前に配列を検証した。用いるプロープはU73004の塩基447から800に対応する。IMX2-33 SLPIの予測転写サイズは1.1Kbである。本研究で分かった実際の転写サイズは1.1Kbであった。

30

【0259】

図9には、クローンIMX2-33、SEQ ID NO: 21のノザンブロット分析の結果を表し、ここでは、実験サンプルとサイズ標準から得たポリA豊富なmRNAを含むアガロースゲルを電気泳動後にブロット化し、精査して、ホスフォイメージャーを用いて撮像して定量化した。図9Aには、治療から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス、治療から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のC57BL/6マウスからの結果と、FVB、大腸炎のないmdrノックアウトマウス、大腸炎のあるmdrノックアウトマウスの大腸から得たサンプルを示す。図9Bには、治療から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のBalb/cマウス、0%及び8%DSSで治療したBalb/cマウス、及びαCD3回腸炎のBalb/cマウス(0、6、30又は72時間後)のからの結果を示す。

40

【0260】

IBDのいくつかのモデルから得たmRNAサンプルにノザンブロットを実施した。DSS大腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、最初のTOGA分

50

析の結果（表 1）と一致して、大腸で最小限の構成的な発現を示したが、炎症とともに著しく増加して、DSS大腸炎は8日後には最大となり、12日後にはさらに高くなることが分かった（図 9 A）。DSS大腸炎のあるBALB/cマウスから得たサンプルを分析すると、同じパターンを示した（図 9 B）。

【0261】

αCD3回腸炎のあるC57BL/6マウスから得たサンプルを分析すると、DSS大腸炎について大腸で見られたほどの調整はなく、小腸で低レベルから中レベルの構成的な発現を示した。30時間後に炎症が最大となるとともに顕著な増加が見られたが、その後低下した（図 9 A）。αCD3回腸炎のあるBALB/cマウスから得たサンプルを分析すると同じパターンを示した（図 9 B）。このパターンは、このモデルのTOGA分析で見られたもの（データは図示せず）と一致した。 10

【0262】

大腸炎の徴候のない健康なmdrノックアウトマウスでは最低限の構成的な発現が見られ、活性大腸炎のあるmdrノックアウトマウスでは発現が増加した（図 9 A）。このパターンは、このモデルのTOGA分析で見られるもの（データは図示せず）と一致した。

【0263】

図 9 のノザンプロットで示された発現を定量化して、各列のG3PDHの量に正規化した。正規化した結果を以下の表 1 1 に示す。

【0264】

【表 1 1】

表 11 (図 9 の定量化)		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	78	197
Day 4	1580	2237
Day 8	7491	8170
Day 12	6313	4390
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	-54
5 %	Not Done	3201
8 %	Not Done	-688
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	658	180
6 Hours	832	1100
30 Hours	1465	2572
72 Hours	526	1245
構成的発現		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
965	14505	30085

【0265】

実施例 1 5

IMX2-48 の伸長配列クローン

IMX2-48 の大食細胞の炎症性蛋白 2 (MIP2)

TOGA 分析では、IMX2-48 がハツカネズミの大食細胞の炎症性蛋白 2、登録番号 X53798 に対応することが分かった（表 3）。

【0266】

フォワードプライマー MIP2-61-FP とリバースプライマー MIP2-345-RP を用いて、C57BL/6 結腸から分離した RNA 由来の cDNA テンプレートから得た 284 bp の産物を PCR した。PCR 産物を pGEM ベクターにサブクローンして、配列を検証した。IMX2-48 MIP2 の予測転写サイズは 1.1 Kb である。 30

【0267】

本発明のこれら及びその他の特徴、側面、及び利点は以下の説明、添付の請求、及び以下の図面を参照することによりより良く理解されよう：

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、未処置のマウス達（第1A図、“0日後”）から分離したコロンから抽出されたmRNA、4日間のDSSを受けるマウス達（第1B図、“4日後”）から分離したコロンから抽出されたmRNA、8日間のDSSを受けるマウス達（第1C図、“8日後”）から分離したコロンから抽出されたmRNA、及び12日間のDSSを受けるマウス達（第1D図、“12日後”）から分離したコロンから抽出されたmRNAから生成されたPCR産物を示す、構文解析ベース（*parasing bases*）CGCGで5' PCRプライマーを使用したTOGA分析（総遺伝子発現分析）の結果の図解であり、ここで垂直インデックス・ラインは最大8日間で到達するDSS処置により上昇調節される約458 b. p. のPCR産物を示し、縦座標は蛍光強度の任意の単位また横座標はヌクレオチドでのPCR産物の長さである。 10

【図2】第2図は第1図に示した458 b. p. PCR産物のより詳細な分析の図解であり；第2A図は文章中に説明されているような延長5' プライマーを使用して得られたPCR産物を示し；第2B図は元々のPCRプライマーを使用して得られたPCR産物を示し、また第2C図では分離され配列されたクロンのPCR産物が元々のPCR産物と同じ長さであることを示すように第2A図と第2B図からのトレースがオーバーレイされており、ここで縦座標は蛍光強度の任意の単位また横座標はヌクレオチドでのPCR産物の長さである。 20

【図3】第3図は、SEQ ID NO: 10、クロンIMX 2-46のノーザン・ブロット分析結果の図解であり、この場合4つの実験試料（0、4、8又は12日間DSS処置）からのポリA濃縮されたmRNAならびにサイズ標準を含むアガロース・ゲルが電気泳動後にブロットされまたSEQ ID NO: 10、放射標識付けしたIMX 2-46で精査され、燐光撮像装置（*phosphor imager*）を使用して撮像してから定量される。1.6 kb転写の相対的発現レベルを示す定量結果は：0日後64、4日後53、8日後223及び12日後269であった。ゲル上に負荷されたRNA量はcyclophilin（“cyc”）についての精査により決定された。 30

【図4】第4図はクロンIMX 2-48のRT-PCRの結果の図解である。 30

【図5】第5図はクロンIMX 2-74のRT-PCRの結果の図解である。

【図6】第6図はSEQ ID NO: 3、クロンIMX 2-17のノーザン・ブロット分析結果の図解であり、この場合、実験試料からのポリA濃縮されたmRNAとサイズ標準を含むアガロース・ゲルは電気泳動後にブロットされ、精査され、燐光撮像装置（*phosphor imager*）で撮像されてから定量される。第6A図は処置から0、4、8及び12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス達、処置後0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のC57BL/6マウス達、ならびにFVBからの大腸からの試料、大腸炎なしのmdrノックアウト・マウス達及び大腸炎をもつmdrノックアウト・マウス達からの結果を示す。第6B図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のBalb/cマウス達、0%、5%及び8%DSSで処置されたBalb/cマウス達、及び処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のBalb/cマウス達からの結果を示す。IMX 2-17 CRP-ductinについての予想転写サイズは6.6 Kb、本研究で見出された実際の転写サイズは約6.5 Kbであった。 40

【図7】第7図はSEQ ID NO: 4、クロンIMX 2-22のノーザン・ブロット分析結果の図解であり、この場合、実験試料からのポリA濃縮されたmRNAとサイズ標準を含むアガロース・ゲルが電気泳動後にブロットされ、精査され、燐光撮像装置（*phosphor imager*）を使用して撮像されてから定量される。第7A図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス達、処置後0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のC57BL/6マウス達、ならびにFVBからの大腸からの試料、大腸炎なしのmdrノックアウト・マウス達、大腸炎のあるmdrノック 50

アウト・マウス達及びC57BL/6脾臓からの結果を示す。第7B図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のあるBalb/cマウス達、処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のあるBalb/cマウス達、及びC57BL/6の正常なリンパ球様組織試料(MLM、PP、脾臓及び胸腺)からの結果を示す。IMX2-22 HPK1についての予想転写サイズは2.7 Kb、本研究で見出された実際の転写サイズは約2.8 Kbであった。

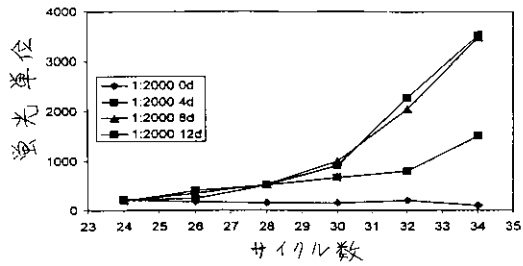
【図8】第8図はSEQ ID NO: 5、クローンIMX2-28のノザン・プロット分析結果の図解であり、この場合、実験試料からのポリA濃縮されたmRNAとサイズ標準を含むアガロース・ゲルが電気泳動後にプロットされ、精査され、燐光撮像装置(phosphor imager)を使用して撮像されてから定量される。第8A図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス達、処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のあるC57BL/6マウス達、ならびにFVBからの大腸からの試料、大腸炎なしのmdrノックアウト・マウス達、大腸炎のあるmdrノックアウト・マウス達からの結果を示す。第8B図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のあるBalb/cマウス達、0%、5%及び8%DSS処置されたBalb/cマウス達、及び処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のあるBalb/cマウス達からの結果を示す。IMX2-28 DRAについての予想転写サイズは2.6 Kb；本研究で見出された実際の転写サイズは約3 Kbであった。

【図9】第9図はSEQ ID NO: 21、クローンIMX2-33のノザン・プロット分析結果の図解であり、この場合、実験試料からのポリA濃縮されたmRNAとサイズ標準を含むアガロース・ゲルが電気泳動後にプロットされ、精査され、燐光撮像装置(phosphor imager)を使用して撮像されてから定量される。第9A図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のC57BL/6マウス達、処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のあるC57BL/6マウス達、ならびにFVBからの大腸からの試料、大腸炎なしのmdrノックアウト・マウス達、大腸炎のあるmdrノックアウト・マウス達からの結果を示す。第9B図は処置から0、4、8又は12日後のDSS大腸炎のあるBalb/cマウス達、0%、5%及び8%DSS処置されたBalb/cマウス達、及び処置から0、6、30又は72時間後のαCD3回腸炎のあるBalb/cマウス達からの結果を示す。IMX2-33 SLPIについての予想転写サイズは1.1 Kb；本研究で見出された実際の転写サイズは約1.1 Kbであった。

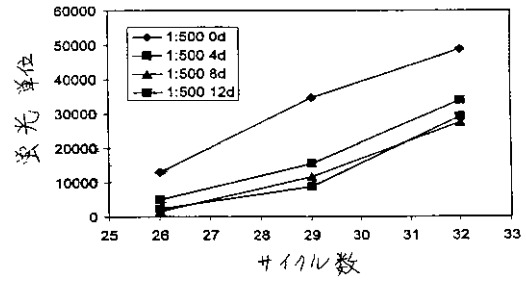
【図 3】



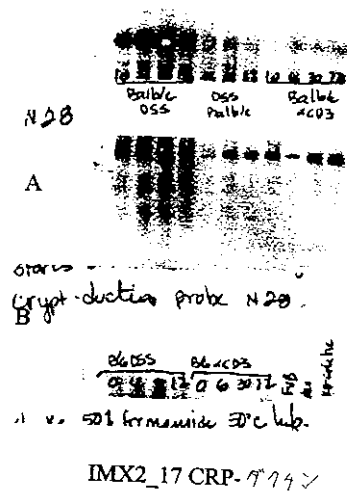
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【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
21 December 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) International Publication Number
WO 00/77166 A2

- (51) International Patent Classification: C12N [US/US]: 7161 Park Village Road, San Diego, CA 92129 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/15973
- (22) International Filing Date: 9 June 2000 (09.06.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 69/138,487 10 June 1999 (10.06.1999) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): DIGITAL GENE TECHNOLOGIES, INC. [US/US]: 11149 North Torrey Pines Road, Suite 110, La Jolla, CA 92037 (US).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): VINEY, Joanne [GB/US]: 5532 Southwest Lander Place, Seattle, WA 98116 (US); SIMS, John, E. [US/US]: 4207 43rd Avenue North East, Seattle, WA 98116 (US); DUBOSE, Robert, F. [US/US]: 6151 156th Place South East, Bellevue, WA 98006 (US); HILBUSH, Brian, S. [US/US]: 13058 Camino Angelico, San Diego, CA 92130 (US); HASEL, Kari, W. [CH/US]: 247 South Nardo Avenue, Solana Beach, CA 92075 (US); BUCHNER, Robert, R.
- (74) Agent: ZIMMERMAN, Roger, P.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, 32nd Floor, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AJ, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, 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, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— Without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 00/77166 A2

(54) Title: GENE EXPRESSION MODULATED IN GASTROINTESTINAL INFLAMMATION

(57) Abstract: Polynucleotides, polypeptides, kits and methods are provided related to regulated genes characteristic of gastrointestinal inflammation.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 1 -

**GENE EXPRESSION MODULATED IN
GASTROINTESTINAL INFLAMMATION**

5

REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application S.N. 60/138,487, filed June 10, 1999, which is incorporated herein by reference.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Chronic inflammatory bowel diseases (IBD) are as a persistent problem in medicine. The two major types of IBD are Crohn's disease (CD), which can affect the whole digestive tract from mouth to anus, and ulcerative colitis (UC), which affects only the large intestine.

Although CD and UC are both characterized by massive gut damage arising from intestinal inflammation, these diseases are quite distinct. Macroscopically, the best distinguishing features of these diseases are that UC is 1) a continuous inflammatory disorder, 2) primarily restricted to the mucosa of the colon and rectum, 3) usually primarily vascular, and 4) usually associated with a striking shortening of the colon. In contrast, inflammation in CD is nearly always discontinuous and may present anywhere in the large or small intestine. With CD the mucosa usually appears 'cobblestoned' and there is fissuring and a thickening of the bowel wall with associated stenosis of the lumen and strictures.

Microscopically, UC is essentially a superficial inflammation of the mucous membrane and even in chronic disease, the muscularis propria and serosa are free of inflammatory infiltration. In contrast, CD presents microscopically as a transmural inflammation, spreading through the mucosa and submucosa into the muscle layers. In UC, crypt abscesses and destruction of the epithelium are common, whereas in CD, a valuable diagnostic feature is the presence of sarcoid type granulomas.

The histological features of both of these diseases suggest that there is a dysregulation of the lymphoid tissue in IBD. Whether the immunological dysregulation is a primary cause

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 2 -

of IBD or whether the inflammatory response is secondary to another mucosal insult, such as a breach in the epithelial barrier, remains unclear.

5 Despite advances in recent years, the precise etiology and pathogenesis of CD and UC remain undefined. In order to try and better understand the mechanistic basis of IBD, much effort has been directed towards the discovery and development of different animal models of inflammatory bowel disease. One of the best characterized systems for studying intestinal inflammation is the mouse model of dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis (I. Okayasu et al. *Gastroenterology* 98:694-702, 1990; H.S. Cooper et al, Laboratory Investigation 69:238-249, 1993; L.A. Dielman et al. *Gastroenterology* 107:1643-1652, 1994; C.O. Elson et al, *Gastroenterology* 109:1344-1367, 1995).

15 DSS is thought to cause breaches in the epithelial tight junctions (J. Ni et al, *Gut* 39:234-241, 1996), thus permitting the huge antigenic load in the gut lumen to come into direct contact with the underlying tissues. As a result, a vigorous immune response directed against antigens located in the gut lumen is initiated in DSS-treated mice. The intestinal inflammation is primarily restricted to the large intestine.

20 The DSS-induced colitis model system is used to examine (i) the nature of the earliest response to epithelial damage, (ii) the mechanisms responsible for recruiting cells to the sites of inflammation, (iii) the nature of the protective immune response at the height of intestinal inflammation and (iv) the mechanisms that direct recovery and trigger the repair of damaged tissues. This model system can be used to examine the mechanisms of induction and recovery of IBD and should aid the identification of genes/proteins that may be able to modulate or prevent intestinal damage or simulate recovery of the mucosa.

30 Given the diversity of factors that may contribute to these processes, a clear need is evident for the discovery, identification and elucidation of the roles of new proteins involved in the different stages of IBD.

Features of DSS-induced colitis

In the DSS-induced colitis model system, weight loss is apparent in mice beginning at

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 3 -

day 4. Histological analysis of the intestine reveals the presence of early patchy lesions identifiable by the loss of epithelial cells and goblet cells. By day 8, weight loss is fairly severe (approximately 20% reduction) and the mice appear moribund. Histologically, the gut epithelium is almost totally destroyed at this stage. There is evidence of a large mixed inflammatory cell infiltration into the lamina propria and submucosa. The inflammatory cell infiltrate appears to be composed primarily of T cells, B cells and granulocytes. By day 12, weight gain is apparent as the mice recover. At this later stage, crypt recovery and epithelial regeneration provide histological evidence of the beginning of repair processes.

10 DSS-induced colitis and human IBD

The primary event in DSS-induced colitis is epithelial cell damage, with inflammation associated with immune activation a secondary event. Whether epithelial cell damage or immune dysregulation is the triggering event in human IBD is unclear. The model of DSS-colitis is therefore useful in providing an opportunity to study the development and consequences of both processes.

20 SUMMARY OF THE INVENTION

Molecules have been identified that correspond to genes that are regulated by the DSS treatment. Such molecules are useful in therapeutic, prognostic and diagnostic applications in the treatment of IBD and other gut pathologies. The present invention provides novel polynucleotides and the encoded polypeptides. Moreover, the present invention relates to vectors, host cells, antibodies, and recombinant methods for producing the polynucleotides and the polypeptides. Also provided are diagnostic methods for detecting disorders related to the polypeptides and the polynucleotides encoding them, and therapeutic methods for treating such disorders. The invention further relates to screening methods for identifying binding partners of the polypeptides.

30 The present invention provides novel polynucleotides and the encoded polypeptides. Moreover, the present invention relates to vectors, host cells, antibodies, and recombinant methods for producing the polynucleotides and the polypeptides. Also provided are diagnostic methods for detecting disorders related to the polypeptides and the polynucleotides

WO 00/77166

PCT/US90/15973

- 4 -

encoding them, and therapeutic methods for treating such disorders. The invention further relates to screening methods for identifying binding partners of the polypeptides.

In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide chosen from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 and SEQ ID NO:62. Another embodiment comprises an isolated nucleic acid molecule at least 95% identical to the isolated nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1-62. A further embodiment comprises an isolated nucleic acid molecule at least ten bases in length that is hybridizable to the isolated nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1-62 under stringent conditions.

In another embodiment, the invention provides an isolated polypeptide encoded by a polynucleotide chosen from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58,

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 5 -

SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 and SEQ ID NO:62. In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule encoding the polypeptide of the present invention.

- 5 In a further embodiment, the invention provides a substantially pure isolated DNA molecule suitable for use as a probe for genes regulated in gastrointestinal inflammation, chosen from the group consisting of the DNA molecules identified in Table 1, having a 5' partial nucleotide sequence and length as described by their digital address, and having a characteristic regulation pattern in gastrointestinal inflammation.
- 10 The present invention also provides a system and method for detecting the presence of a gene regulated in gastrointestinal inflammation. In one embodiment, the present invention provides a kit for suitable for detecting the presence of a gene regulated in gastrointestinal inflammation, comprising at least one polynucleotide of the present invention, or fragment thereof having at least 10 contiguous bases, in an amount sufficient for at least one assay; label means; instructions for use; and suitable packaging material. In one embodiment, the polynucleotide is chosen from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 and SEQ ID NO:62. Another embodiment comprises a polynucleotide at least 95% identical to the isolated nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1-62. A further embodiment comprises a polynucleotide at least ten bases in length that is hybridizable to the isolated nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1-62 under stringent conditions. In yet another embodiment, the polynucleotide is chosen from the group consisting of the DNA molecules identified in Table 1, having a 5' partial nucleotide

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 6 -

sequence and length as described by their digital address, and having a characteristic regulation pattern in gastrointestinal inflammation.

5 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

These and other features, aspects, and advantages of the present invention will become better understood with reference to the following description, appended claims, and accompanying drawings where:

10

Figure 1 is a graphical representation of the results of TOGA analysis (Total Gene expression Analysis) using a 5' PCR primer with parsing bases CGCG, showing PCR products produced from mRNA extracted from colons isolated from untreated mice (Figure 1A, "0 Days"), mRNA extracted from colons isolated from mice receiving DSS for four days (Figure 1B, "4 Days"), mRNA extracted from colons isolated from mice receiving DSS for eight days (Figure 1C, "8 Days"), and mRNA extracted from colons isolated from mice receiving DSS for twelve days (Figure 1D, "12 Days"), where the vertical index line indicates a PCR product of about 458 b.p. that is up-regulated by DSS treatment, reaching a maximum at eight days, where the ordinate is in arbitrary units of fluorescence intensity and the abscissa is length of PCR product in nucleotides;

20

Figure 2 is a graphical representation of more detailed analysis of the 458 b.p. PCR product indicated in Figure 1; Figure 2A shows the PCR product obtained using an extended 5' primer as described in the text; Figure 2B shows the PCR products obtained using the original PCR primers, and in Figure 2C, the traces from Figure 2A and 2B are overlaid, demonstrating that the PCR product of the isolated and sequenced clone is the same length as the original PCR product, where the ordinate is in arbitrary units of fluorescence intensity and the abscissa is length of PCR product in nucleotides;

25

Figure 3 is a graphical representation of the results of Northern Blot analysis of clone IMX 2_46, SEQ ID NO: 10, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the four experimental samples (0, 4, 8 or 12 days DSS treatment) as well as size standards was blotted after electrophoresis and probed with radiolabelled IMX 2_46, SEQ ID NO: 10, imaged using a phosphorimager and quantified. Quantitative results showing the relative

30

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 7 -

expression levels of the 1.6 kb transcript were: 0 day, 64; 4 days, 53; 8 days, 223; and 12 days, 269. The amount of RNA loaded on the gel was determined by probing for cyclophilin ("cyc").

5 Figure 4 is a graphical representation of the results of RT-PCR of clone IMX2_48.

Figure 5 is a graphical representation of the results of RT-PCR of clone IMX2_74.

Figure 6 is a graphical representation of the results of Northern blot analysis of clone
10 IMX2_17, SEQ ID NO: 3, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the
experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed, imaged
using a phosphorimager and quantified. Figure 6A shows the results from C57BL/6 mice
with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30
or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-
15 out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 6B shows the results
from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice treated
with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after
treatment. The predicted transcript size for IMX2_17 CRP-ductin is 6.6 Kb; the actual
transcript size found in this study was approximately 6.5 Kb.

20

Figure 7 is a graphical representation of the results of Northern blot analysis of clone
IMX2_22, SEQ ID NO: 4, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the
experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed, imaged
using a phosphorimager and quantified. Figure 7A shows the results from C57BL/6 mice
25 with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30
or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-
out mice without colitis, mdr knock-out mice with colitis and C57BL/6 spleen. Figure 7B
shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c
mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, and C57BL/6 normal lymphoid
30 tissue samples (MLM, PP, spleen and thymus). The predicted transcript size for IMX2_22
HPK1 is 2.7 Kb; the actual transcript size found in this study was approximately 2.8 Kb.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 8 -

Figure 8 is a graphical representation of the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_28, SEQ ID NO: 5, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed, imaged using a phosphorimager and quantified. Figure 8A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 8B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice treated with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment. The predicted transcript size for IMX2_28 DRA is 2.6 Kb; the actual transcript size found in this study was approximately 3 Kb.

Figure 9 is a graphical representation of the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_33, SEQ ID NO:21, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed, imaged using a phosphorimager and quantified. Figure 9A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 9B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice treated with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment. The predicted transcript size for IMX2_33 SLPI is 1.1 Kb; the actual transcript size found in this study was 1.1 Kb.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Definitions

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used throughout this specification.

In the present invention, "isolated" refers to material removed from its original environment (e.g., the natural environment if it is naturally occurring), and thus is altered "by

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 9 -

the hand of man" from its natural state. For example, an isolated polynucleotide could be part of a vector or a composition of matter, or could be contained within a cell, and still be "isolated" because that vector, composition of matter, or particular cell is not the original environment of the polynucleotide.

5

In the present invention, a "secreted" protein refers to those proteins capable of being directed to the ER, secretory vesicles, or the extracellular space as a result of a signal sequence, as well as those proteins released into the extracellular space without necessarily containing a signal sequence. If the secreted protein is released into the extracellular space, the secreted protein can undergo extracellular processing to produce a "mature" protein. Release into the extracellular space can occur by many mechanisms, including exocytosis and proteolytic cleavage.

10

As used herein, a "polynucleotide" refers to a molecule having a nucleic acid sequence contained in SEQ ID NO:1-62. For example, the polynucleotide can contain all or part of the nucleotide sequence of the full length cDNA sequence, including the 5' and 3' untranslated sequences, the coding region, with or without the signal sequence, the secreted protein coding region, as well as fragments, epitopes, domains, and variants of the nucleic acid sequence. Moreover, as used herein, a "polypeptide" refers to a molecule having the translated amino acid sequence generated from the polynucleotide as broadly defined.

20

A "polynucleotide" of the present invention also includes those polynucleotides capable of hybridizing, under stringent hybridization conditions, to sequences contained in SEQ ID NO:1-62, or the complement thereof, or the cDNA. "Stringent hybridization conditions" refers to an overnight incubation at 42° C in a solution comprising 50% formamide, 5x SSC (750 mM NaCl, 75 mM sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 µg/ml denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C.

25

Also contemplated are nucleic acid molecules that hybridize to the polynucleotides of the present invention at lower stringency hybridization conditions. Changes in the stringency of hybridization and signal detection are primarily accomplished through the manipulation of formamide concentration (lower percentages of formamide result in lowered stringency); salt

30

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 10 -

conditions, or temperature. For example, lower stringency conditions include an overnight incubation at 37°C in a solution comprising 6X SSPE (20X SSPE – 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4), 0.5% SDS, 30% formamide, 100 ug/ml salmon sperm blocking DNA;

- 5 followed by washes at 50°C with 1x SSPE, 0.1% SDS. In addition, to achieve even lower stringency, washes performed following stringent hybridization can be done at higher salt concentrations (e.g. 5x SSC).

- Note that variations in the above conditions may be accomplished through the inclusion and/or substitution of alternate blocking reagents used to suppress background in hybridization experiments. Typical blocking reagents include Denhardt's reagent, BLOTTO, heparin, denatured salmon sperm DNA, and commercially available proprietary formulations. The inclusion of specific blocking reagents may require modification of the hybridization conditions described above, due to problems with compatibility.

- 15 Of course, a polynucleotide which hybridizes only to polyA⁺ sequences (such as any 3' terminal polyA⁺ tract of a cDNA shown in the sequence listing), or to a complementary stretch of T (or U) residues, would not be included in the definition of "polynucleotide," since such a polynucleotide would hybridize to any nucleic acid molecule containing a poly (A) stretch or the complement thereof (e.g., practically any double-stranded cDNA clone).

- The polynucleotide of the present invention can be composed of any polyribonucleotide or polynucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. For example, polynucleotides can be composed of single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, the polynucleotide can be composed of triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. A polynucleotide may also contain one or more modified bases or DNA or RNA backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications can

WO 00/77166

PCT/US99/15973

- 11 -

be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically, or metabolically modified forms.

The polypeptide of the present invention can be composed of amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres, and may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. The polypeptides may be modified by either natural processes, such as posttranslational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications can occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present in the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched, for example, as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched, and branched cyclic polypeptides may result from posttranslational natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cysteine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, pegylation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination. (See, for instance, PROTEINS – STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992).)

"A polypeptide having biological activity" refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the present invention,

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 12 -

including mature forms, as measured in a particular biological assay, with or without dose dependency. In the case where dose dependency does exist, it need not be identical to that of the polypeptide, but rather substantially similar to the dose-dependence in a given activity as compared to the polypeptide of the present invention (i.e., the candidate polypeptide will exhibit greater activity or not more than about 25-fold less and, preferably, not more than about tenfold less activity, and most preferably, not more than about three-fold less activity relative to the polypeptide of the present invention.).

The translated amino acid sequence, beginning with the methionine, is identified although other reading frames can also be easily translated using known molecular biology techniques. The polypeptides produced by the translation of these alternative open reading frames are specifically contemplated by the present invention.

SEQ ID NO:1-62 and the translations of SEQ ID NO:1-62 are sufficiently accurate and otherwise suitable for a variety of uses well known in the art and described further below. These probes will also hybridize to nucleic acid molecules in biological samples, thereby enabling a variety of forensic and diagnostic methods of the invention. Similarly, polypeptides identified from the translations of SEQ ID NO:1-62 may be used to generate antibodies which bind specifically to the secreted proteins encoded by the cDNA clones identified.

Nevertheless, DNA sequences generated by sequencing reactions can contain sequencing errors. The errors exist as misidentified nucleotides, or as insertions or deletions of nucleotides in the generated DNA sequence. The erroneously inserted or deleted nucleotides cause frame shifts in the reading frames of the predicted amino acid sequence. In these cases, the predicted amino acid sequence diverges from the actual amino acid sequence, even though the generated DNA sequence may be greater than 99.9% identical to the actual DNA sequence (for example, one base insertion or deletion in an open reading frame of over 1000 bases).

The present invention also relates to the genes corresponding to SEQ ID NO:1-62, and translations of SEQ ID NO:1-62. The corresponding gene can be isolated in accordance with known methods using the sequence information disclosed herein. Such methods include preparing probes or primers from the disclosed sequence and identifying or amplifying the corresponding gene from appropriate sources of genomic material.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 13 -

Also provided in the present invention are species homologues. Species homologues may be isolated and identified by making suitable probes or primers from the sequences provided herein and screening a suitable nucleic acid source for the desired homologue.

The polypeptides of the invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

The polypeptides may be in the form of the secreted protein, including the mature form, or may be a part of a larger protein, such as a fusion protein (see below). It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which aid in purification, such as multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

The polypeptides of the present invention are preferably provided in an isolated form, and preferably are substantially purified. A recombinantly produced version of a polypeptide, including the secreted polypeptide, can be substantially purified by the one-step method described in Smith and Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988). Polypeptides of the invention also can be purified from natural or recombinant sources using antibodies of the invention raised against the secreted protein in methods which are well known in the art.

Signal Sequences

Methods for predicting whether a protein has a signal sequence, as well as the cleavage point for that sequence, are available. For instance, the method of McGeoch, *Virus Res.* 3:271-286 (1985), uses the information from a short N-terminal charged region and a subsequent uncharged region of the complete (uncleaved) protein. The method of von Heinje, *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690 (1986) uses the information from the residues surrounding the cleavage site, typically residues -13 to +2, where +1 indicates the amino terminus of the secreted protein. Therefore, from a deduced amino acid sequence, a signal sequence and mature sequence can be identified.

WO 00/77166

PCT/US06/15973

- 14 -

Polynucleotide and Polypeptide Variants

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide differing from the polynucleotide or polypeptide of the present invention, but retaining essential properties thereof. Generally, variants are overall closely similar, and, in many regions, identical to the polynucleotide or polypeptide of the present invention.

"Identity" per se has an art-recognized meaning and can be calculated using published techniques. (See, e.g.: (COMPUTATIONAL MOLECULAR BIOLOGY, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, (1988); BIOCOMPUTING: INFORMATICS AND GENOME PROJECTS. Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, (1993); COMPUTER ANALYSIS OF SEQUENCE DATA, PART I. Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, (1994); SEQUENCE ANALYSIS IN MOLECULAR BIOLOGY, von Heinje, G., Academic Press, (1987); and SEQUENCE ANALYSIS PRIMER, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, (1991).) While there exists a number of methods to measure identity between two polynucleotide or polypeptide sequences, the term "identity" is well known to skilled artisans. (Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988).) Methods commonly employed to determine identity or similarity between two sequences include, but are not limited to, those disclosed in "Guide to Huge Computers," Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, (1994), and Carillo, H., and Lipton, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988). Methods for aligning polynucleotides or polypeptides are codified in computer programs, including the GCG program package (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research (1984) 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F. et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), Bestfit program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711 (using the local homology algorithm of Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981).))

When using any of the sequence alignment programs to determine whether a particular sequence is, for instance, 95% identical to a reference sequence, the parameters are set so that the percentage of identity is calculated over the full length of the reference polynucleotide and that gaps in identity of up to 5% of the total number of nucleotides in the reference polynucleotide are allowed.

A preferred method for determining the best overall match between a query sequence (a sequence of the present invention) and a subject sequence, also referred to as a global

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 15 -

sequence alignment, can be determined using the FASTDB computer program based on the algorithm of Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990).) The term "sequence" includes nucleotide and amino acid sequences. In a sequence alignment the query and subject sequences are either both nucleotide sequences or both amino acid sequences. The result of said global sequence alignment is in percent identity. Preferred parameters used in a FASTDB search of a DNA sequence to calculate percent identity are: Matrix=Unitary, k-tuple=4, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=30, Randomization Group Length=0, and Cutoff Score=1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty 0.05, and Window Size=500 or query sequence length in nucleotide bases, whichever is shorter. Preferred parameters employed to calculate percent identity and similarity of an amino acid alignment are: Matrix=PAM 150, k-tuple=2, Mismatch Penalty= 1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0.05, and Window Size=500 or query sequence length in amino acid residues, whichever is shorter.

As an illustration, a polynucleotide having a nucleotide sequence of at least 95% "identity" to a sequence contained in SEQ ID NO:1-62 means that the polynucleotide is identical to a sequence contained in SEQ ID NO:1-62 or the cDNA except that the polynucleotide sequence may include up to five point mutations per each 100 nucleotides of the total length (not just within a given 100 nucleotide stretch). In other words, to obtain a polynucleotide having a nucleotide sequence at least 95% identical to SEQ ID NO:1-62, up to 5% of the nucleotides in the sequence contained in SEQ ID NO:1-62 or the cDNA can be deleted, inserted, or substituted with other nucleotides. These changes may occur anywhere throughout the polynucleotide.

Further embodiments of the present invention include polynucleotides having at least 80% identity, more preferably at least 90% identity, and most preferably at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a sequence contained in SEQ ID NO:1-62. Of course, due to the degeneracy of the genetic code, one of ordinary skill in the art will immediately recognize that a large number of the polynucleotides having at least 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identity will encode a polypeptide identical to an amino acid sequence contained in the translations of SEQ ID NO:1-62.

Similarly, by a polypeptide having an amino acid sequence having at least, for example, 95% "identity" to a reference polypeptide, is intended that the amino acid sequence of the polypeptide is identical to the reference polypeptide except that the polypeptide sequence may include up to five amino acid alterations per each 100 amino acids of the total

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 16 -

length of the reference polypeptide. In other words, to obtain a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a reference amino acid sequence, up to 5% of the amino acid residues in the reference sequence may be deleted or substituted with another amino acid, or a number of amino acids up to 5% of the total amino acid residues in the reference sequence may be inserted into the reference sequence. These alterations of the reference sequence may occur at the amino or carboxy terminal positions of the reference amino acid sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among residues in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence.

Further embodiments of the present invention include polypeptides having at least 80% identity, more preferably at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, and most preferably at least 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence contained in translations of SEQ ID NO:1-62. Preferably, the above polypeptides should exhibit at least one biological activity of the protein.

In a preferred embodiment, polypeptides of the present invention include polypeptides having at least 90% similarity, more preferably at least 95% similarity, and still more preferably at least 96%, 97%, 98%, or 99% similarity to an amino acid sequence contained in translations of SEQ ID NO:1-62.

The variants may contain alterations in the coding regions, non-coding regions, or both. Especially preferred are polynucleotide variants containing alterations which produce silent substitutions, additions, or deletions, but do not alter the properties or activities of the encoded polypeptide. Nucleotide variants produced by silent substitutions due to the degeneracy of the genetic code are preferred. Moreover, variants in which 5-10, 1-5, or 1-2 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination are also preferred. Polynucleotide variants can be produced for a variety of reasons, e.g., to optimize codon expression for a particular host (change codons in the human mRNA to those preferred by a bacterial host such as *E. coli*).

Naturally occurring variants are called "allelic variants," and refer to one of several alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism. (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985).) These allelic variants can vary at

WO 00/77366

PCT/US00/15973

- 17 -

either the polynucleotide and/or polypeptide level. Alternatively, non-naturally occurring variants may be produced by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

Using known methods of protein engineering and recombinant DNA technology,
5 variants may be generated to improve or alter the characteristics of the polypeptides of the present invention. For instance, one or more amino acids can be deleted from the N-terminus or C-terminus of the secreted protein without substantial loss of biological function. The authors of Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993) reported variant KGF proteins having heparin binding activity even after deleting 3, 8, or 27 amino-terminal amino acid
10 residues. Similarly, Interferon gamma exhibited up to ten times higher activity after deleting 8-10 amino acid residues from the carboxy terminus of this protein. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988).)

Moreover, ample evidence demonstrates that variants often retain a biological activity
15 similar to that of the naturally occurring protein. For example, Gayle and coworkers (*J. Biol. Chem.* 268:22105-22111 (1993)) conducted extensive mutational analysis of human cytokine IL-1a. They used random mutagenesis to generate over 3,500 individual IL-1a mutants that averaged 2.5 amino acid changes per variant over the entire length of the molecule. Multiple mutations were examined at every possible amino acid position. The investigators found that
20 "[m]ost of the molecule could be altered with little effect on either [binding or biological activity]." (See Gayle et al., (1993), Abstract.) In fact, only 23 unique amino acid sequences, out of more than 3,500 nucleotide sequences examined, produced a protein that significantly differed in activity from wild-type.

25 Furthermore, even if deleting one or more amino acids from the N-terminus or C-terminus of a polypeptide results in modification or loss of one or more biological functions, other biological activities may still be retained. For example, the ability of a deletion variant to induce and/or to bind antibodies which recognize the secreted form will likely be retained when less than the majority of the residues of the secreted form are removed from the N-
30 terminus or C-terminus. Whether a particular polypeptide lacking N- or C-terminal residues of a protein retains such immunogenic activities can readily be determined by routine methods described herein and otherwise known in the art.

Thus, the invention further includes polypeptide variants which show substantial
35 biological activity. Such variants include deletions, insertions, inversions, repeats, and substitutions selected according to general rules known in the art so as have little effect on

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 18 -

activity. For example, guidance concerning how to make phenotypically silent amino acid substitutions is provided in Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-1310 (1990), wherein the authors indicate that there are two main strategies for studying the tolerance of an amino acid sequence to change.

5

The first strategy exploits the tolerance of amino acid substitutions by natural selection during the process of evolution. By comparing amino acid sequences in different species, conserved amino acids can be identified. These conserved amino acids are likely important for protein function. In contrast, the amino acid positions where substitutions have been tolerated by natural selection indicates that these positions are not critical for protein function. Thus, positions tolerating amino acid substitution could be modified while still maintaining biological activity of the protein.

10

The second strategy uses genetic engineering to introduce amino acid changes at specific positions of a cloned gene to identify regions critical for protein function. For example, site directed mutagenesis or alanine-scanning mutagenesis (introduction of single alanine mutations at every residue in the molecule) can be used. (Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989).) The resulting mutant molecules can then be tested for biological activity.

15

As the authors state, these two strategies have revealed that proteins are surprisingly tolerant of amino acid substitutions. The authors further indicate which amino acid changes are likely to be permissive at certain amino acid positions in the protein. For example, most buried (within the tertiary structure of the protein) amino acid residues require nonpolar side chains, whereas few features of surface side chains are generally conserved. Moreover, tolerated conservative amino acid substitutions involve replacement of the aliphatic or hydrophobic amino acids Ala, Val, Leu and Ile; replacement of the hydroxyl residues Ser and Thr; replacement of the acidic residues Asp and Glu; replacement of the amide residues Asn and Gln; replacement of the basic residues Lys, Arg, and His; replacement of the aromatic residues Phe, Tyr, and Trp,

20

25

30

Besides conservative amino acid substitution, variants of the present invention include (i) substitutions with one or more of the non-conserved amino acid residues, where the substituted amino acid residues may or may not be encoded by the genetic code, or (ii) substitution with one or more of amino acid residues having a substituent group, or (iii)

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 19 -

fusion of the mature polypeptide with another compound, such as a compound to increase the stability and/or solubility of the polypeptide (for example, polyethylene glycol), or (iv) fusion of the polypeptide with additional amino acids, such as an IgG Fc fusion region peptide, or leader or secretory sequence, or a sequence facilitating purification. Such variant

5 polypeptides are deemed to be within the scope of those skilled in the art from the teachings herein.

For example, polypeptide variants containing amino acid substitutions of charged amino acids with other charged or neutral amino acids may produce proteins with improved characteristics, such as less aggregation. Aggregation of pharmaceutical formulations both

10 reduces activity and increases clearance due to the aggregate's immunogenic activity. (Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins et al., Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993).)

15 Polynucleotide and Polypeptide Fragments

In the present invention, a "polynucleotide fragment" refers to a short polynucleotide having a nucleic acid sequence contained in that shown in SEQ ID NO:1-62. The short nucleotide fragments are preferably at least about 15 nt, and more preferably at least about 20 nt, still more preferably at least about 30 nt, and even more preferably, at least about 40 nt in

20 length. A fragment "at least 20 nt in length," for example, is intended to include 20 or more contiguous bases from the cDNA sequence contained in that shown in SEQ ID NO:1-62. These nucleotide fragments are useful as diagnostic probes and primers as discussed herein. Of course, larger fragments (e.g., 50, 150, and more nucleotides) are preferred.

Moreover, representative examples of polynucleotide fragments of the invention, include, for example, fragments having a sequence from about nucleotide number 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, to the end of SEQ ID NO:1-62. In this context "about" includes the particularly recited ranges, larger or smaller by

25 several (5, 4, 3, 2, or 1) nucleotides, at either terminus or at both termini. Preferably, these fragments encode a polypeptide which has biological activity.

30

In the present invention, a "polypeptide fragment" refers to a short amino acid sequence contained in the translations of SEQ ID NO:1-62. Protein fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which the fragment forms a part or

35 region, most preferably as a single continuous region. Representative examples of polypeptide fragments of the invention, include, for example, fragments from about amino

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 20 -

acid number 1-20, 21-40, 41-60, or 61 to the end of the coding region. Moreover, polypeptide fragments can be about 20, 30, 40, 50 or 60 amino acids in length. In this context "about" includes the particularly recited ranges, larger or smaller by several (5, 4, 3, 2, or 1) amino acids, at either extreme or at both extremes.

5

Preferred polypeptide fragments include the secreted protein as well as the mature form. Further preferred polypeptide fragments include the secreted protein or the mature form having a continuous series of deleted residues from the amino or the carboxy terminus, or both. For example, any number of amino acids, ranging from 1-60, can be deleted from the amino terminus of either the secreted polypeptide or the mature form. Similarly, any number of amino acids, ranging from 1-30, can be deleted from the carboxy terminus of the secreted protein or mature form. Furthermore, any combination of the above amino and carboxy terminus deletions are preferred. Similarly, polynucleotide fragments encoding these polypeptide fragments are also preferred.

10

Also preferred are polypeptide and polynucleotide fragments characterized by structural or functional domains, such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions. Polypeptide fragments of the translations of SEQ ID NO:1-62 falling within conserved domains are specifically contemplated by the present invention. Moreover, polynucleotide fragments encoding these domains are also contemplated.

15

Other preferred fragments are biologically active fragments. Biologically active fragments are those exhibiting activity similar, but not necessarily identical, to an activity of the polypeptide of the present invention. The biological activity of the fragments may include an improved desired activity, or a decreased undesirable activity.

20

Epitopes & Antibodies

In the present invention, "epitopes" refer to polypeptide fragments having antigenic or immunogenic activity in an animal, especially in a human. A preferred embodiment of the present invention relates to a polypeptide fragment comprising an epitope, as well as the polynucleotide encoding this fragment. A region of a protein molecule to which an antibody can bind is defined as an "antigenic epitope." In contrast, an "immunogenic epitope" is

25

30

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 21 -

defined as a part of a protein that elicits an antibody response. (See, for instance, Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002 (1983).)

5 Fragments which function as epitopes may be produced by any conventional means. (See, e.g., Houghton, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135 (1985) further described in U.S. Patent No. 4,631,211.)

10 In the present invention, antigenic epitopes preferably contain a sequence of at least seven, more preferably at least nine, and most preferably between about 15 to about 30 amino acids. Antigenic epitopes are useful to raise antibodies, including monoclonal antibodies, that specifically bind the epitope. (See, for instance, Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984); Sutcliffe, J. G. et al., Science 219:660-666 (1983).)

15 Similarly, immunogenic epitopes can be used to induce antibodies according to methods well known in the art. (See, for instance, Sutcliffe et al., supra; Wilson et al., supra; Chow, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; and Bittle, F. J. et al., J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985).) A preferred immunogenic epitope includes the secreted protein. The immunogenic epitopes may be presented together with a carrier protein, such as an albumin, to an animal system (such as rabbit or mouse) or, if it is long enough (at least
20 about 25 amino acids), without a carrier. However, immunogenic epitopes comprising as few as 8 to 10 amino acids have been shown to be sufficient to raise antibodies capable of binding to, at the very least, linear epitopes in a denatured polypeptide (e.g., in Western blotting.)

As used herein, the term "antibody" (Ab) or "monoclonal antibody" (Mab) is meant to
25 include intact molecules as well as antibody fragments (such as, for example, Fab and F(ab')₂ fragments) which are capable of specifically binding to protein. Fab and F(ab')₂ fragments lack the Fc fragment of intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and may have less non-specific tissue binding than an intact antibody. (Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983).) Thus, these fragments are preferred, as well as the products of a FAB or
30 other immunoglobulin expression library. Moreover, antibodies of the present invention include chimeric, single chain, and humanized antibodies.

Additional embodiments include chimeric antibodies, e.g., humanized versions of murine monoclonal antibodies. Such humanized antibodies may be prepared by known
35 techniques, and offer the advantage of reduced immunogenicity when the antibodies are

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 22 -

- administered to humans. In one embodiment, a humanized monoclonal antibody comprises the variable region of a murine antibody (or just the antigen binding site thereof) and a constant region derived from a human antibody. Alternatively, a humanized antibody fragment may comprise the antigen binding site of a murine monoclonal antibody and a variable region fragment (lacking the antigen-binding site) derived from a human antibody.
- 5 Procedures for the production of chimeric and further engineered monoclonal antibodies include those described in Riechmann et al. (*Nature* 332:323, 1988), Liu et al. (*PNAS* 84:3439, 1987), Larrick et al. (*Bio/Technology* 7:934, 1989), and Winter and Harris (*TIPS* 14:139, May, 1993).
- 10 One method for producing an antibody comprises immunizing a non-human animal, such as a transgenic mouse, with a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62, whereby antibodies directed against the polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62 are generated in said animal. Procedures
- 15 have been developed for generating human antibodies in non-human animals. The antibodies may be partially human, or preferably completely human. Non-human animals (such as transgenic mice) into which genetic material encoding one or more human immunoglobulin chains has been introduced may be employed. Such transgenic mice may be genetically altered in a variety of ways. The genetic manipulation may result in human immunoglobulin
- 20 polypeptide chains replacing endogenous immunoglobulin chains in at least some (preferably virtually all) antibodies produced by the animal upon immunization. Antibodies produced by immunizing transgenic animals with a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62 are provided herein.
- 25 Mice in which one or more endogenous immunoglobulin genes are inactivated by various means have been prepared. Human immunoglobulin genes have been introduced into the mice to replace the inactivated mouse genes. Antibodies produced in the animals incorporate human immunoglobulin polypeptide chains encoded by the human genetic material introduced into the animal. Examples of techniques for production and use of such
- 30 transgenic animals are described in U.S. Patents 5,814,318, 5,569,825, and 5,545,806, which are incorporated by reference herein.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 23 -

Monoclonal antibodies may be produced by conventional procedures, e.g., by immortalizing spleen cells harvested from the transgenic animal after completion of the immunization schedule. The spleen cells may be fused with myeloma cells to produce hybridomas, by conventional procedures.

5

A method for producing a hybridoma cell line comprises immunizing such a transgenic animal with an immunogen comprising at least seven contiguous amino acid residues of a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62; harvesting spleen cells from the immunized animal; fusing the harvested spleen cells to a myeloma cell line, thereby generating hybridoma cells; and identifying a hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody that binds a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62. Such hybridoma cell lines, and monoclonal antibodies produced therefrom, are encompassed by the present invention. Monoclonal antibodies secreted by the hybridoma cell line are purified by conventional techniques.

15

Antibodies may be employed in an *in vitro* procedure, or administered *in vivo* to inhibit biological activity induced by a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62. Disorders caused or exacerbated (directly or indirectly) by the interaction of such polypeptides of the present invention with cell surface receptors thus may be treated. A therapeutic method involves *in vivo* administration of a blocking antibody to a mammal in an amount effective for reducing a biological activity induced by a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62.

20

Also provided herein are conjugates comprising a detectable (e.g., diagnostic) or therapeutic agent, attached to an antibody directed against a polypeptide translated from a nucleotide sequence chosen from SEQ ID NO:1-62. Examples of such agents are well known, and include but are not limited to diagnostic radionuclides, therapeutic radionuclides, and cytotoxic drugs. The conjugates find use in *in vitro* or *in vivo* procedures.

25

30 Fusion Proteins

Any polypeptide of the present invention can be used to generate fusion proteins. For example, the polypeptide of the present invention, when fused to a second protein, can be used as an antigenic tag. Antibodies raised against the polypeptide of the present invention can be used to indirectly detect the second protein by binding to the polypeptide. Moreover,

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 24 -

because secreted proteins target cellular locations based on trafficking signals, the polypeptides of the present invention can be used as targeting molecules once fused to other proteins.

5 Examples of domains that can be fused to polypeptides of the present invention include not only heterologous signal sequences, but also other heterologous functional regions. The fusion does not necessarily need to be direct, but may occur through linker sequences.

10 Moreover, fusion proteins may also be engineered to improve characteristics of the polypeptide of the present invention. For instance, a region of additional amino acids, particularly charged amino acids, may be added to the N-terminus of the polypeptide to improve stability and persistence during purification from the host cell or subsequent handling and storage. Also, peptide moieties may be added to the polypeptide to facilitate
15 purification. Such regions may be removed prior to final preparation of the polypeptide. The addition of peptide moieties to facilitate handling of polypeptides are familiar and routine techniques in the art.

20 Moreover, polypeptides of the present invention, including fragments, and specifically epitopes, can be combined with parts of the constant domain of immunoglobulins (IgG), resulting in chimeric polypeptides. These fusion proteins facilitate purification and show an increased half-life in vivo. One reported example describes chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. (EP A 394,827;
25 Traunecker et al., Nature 331:84-86 (1988).) Fusion proteins having disulfide-linked dimeric structures (due to the IgG) can also be more efficient in binding and neutralizing other molecules, than the monomeric secreted protein or protein fragment alone. (Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964 (1995).)

30 Similarly, EP-A-0 464 533 (Canadian counterpart 2045869) discloses fusion proteins comprising various portions of constant region of immunoglobulin molecules together with another human protein or part thereof. In many cases, the Fc part in a fusion protein is beneficial in therapy and diagnosis, and thus can result in, for example, improved pharmacokinetic properties. (EP-A 0 232 262.) Alternatively, deleting the Fc part after the
35 fusion protein has been expressed, detected, and purified, would be desired. For example, the Fc portion may hinder therapy and diagnosis if the fusion protein is used as an antigen for

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 25 -

immunizations. In drug discovery, for example, human proteins, such as hIL-5, have been fused with Fc portions for the purpose of high-throughput screening assays to identify antagonists of hIL-5. (See, D. Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson et al., J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995).)

5

Moreover, the polypeptides of the present invention can be fused to marker sequences, such as a peptide which facilitates purification of the fused polypeptide. In preferred embodiments, the marker amino acid sequence is a hexa-histidine peptide, such as the tag provided in a pQE vector (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), among others, many of which are commercially available. As described in Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), for instance, hexa-histidine provides for convenient purification of the fusion protein. Another peptide tag useful for purification, the "HA" tag, corresponds to an epitope derived from the influenza hemagglutinin protein. (Wilson et al., Cell 37:767 (1984).)

15

Thus, any of these above fusions can be engineered using the polynucleotides or the polypeptides of the present invention.

Vectors, Host Cells, and Protein Production

20

The present invention also relates to vectors containing the polynucleotide of the present invention, host cells, and the production of polypeptides by recombinant techniques. The vector may be, for example, a phage, plasmid, viral, or retroviral vector. Retroviral vectors may be replication competent or replication defective. In the latter case, viral propagation generally will occur only in complementing host cells.

25

The polynucleotides may be joined to a vector containing a selectable marker for propagation in a host. Generally, a plasmid vector is introduced in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid. If the vector is a virus, it may be packaged in vitro using an appropriate packaging cell line and then transduced into host cells.

30

The polynucleotide insert should be operatively linked to an appropriate promoter, such as the phage lambda PL promoter, the E. coli lac, trp, phoA and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs, to name a few. Other suitable promoters will be known to the skilled artisan. The expression constructs will further contain sites for transcription initiation, termination, and, in the transcribed region, a ribosome

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 26 -

binding site for translation. The coding portion of the transcripts expressed by the constructs will preferably include a translation initiating codon at the beginning and a termination codon (UAA, UGA or UAG) appropriately positioned at the end of the polypeptide to be translated.

5 As indicated, the expression vectors will preferably include at least one selectable marker. Such markers include dihydrofolate reductase, G418 or neomycin resistance for eukaryotic cell culture and tetracycline, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing in *E. coli* and other bacteria. Representative examples of appropriate hosts include, but are not limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells; insect cells such as *Drosophila* S2 and 10 *Spodoptera Sf9* cells; animal cells such as CHO, COS, 293, Bowes melanoma cells and plant cells. Appropriate culture mediums and conditions for the above-described host cells are known in the art.

15 Among vectors preferred for use in bacteria include pQE70, pQE60 and pQE-9, available from QIAGEN, Inc.; pBluescript vectors, Phagescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene Cloning Systems, Inc.; and ptc99a, pKK223-3, pKK223-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia Biotech, Inc. Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 and pSG available from 20 Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from Pharmacia. Other suitable vectors will be readily apparent to the skilled artisan.

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, 25 electroporation, transduction, infection, or other methods. Such methods are described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986). It is specifically contemplated that the polypeptides of the present invention may in fact be expressed by a host cell lacking a recombinant vector.

30 A polypeptide of this invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid 35 chromatography ("HPLC") is employed for purification.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 27 -

Polypeptides of the present invention, and preferably the secreted form, can also be recovered from: products purified from natural sources, including bodily fluids, tissues and cells, whether directly isolated or cultured; products of chemical synthetic procedures; and products produced by recombinant techniques from a prokaryotic or eukaryotic host, including, for example, bacterial, yeast, higher plant, insect, and mammalian cells. Depending upon the host employed in a recombinant production procedure, the polypeptides of the present invention may be glycosylated or may be non-glycosylated. In addition, polypeptides of the invention may also include an initial modified methionine residue, in some cases as a result of host-mediated processes. Thus, it is well known in the art that the N-terminal methionine encoded by the translation initiation codon generally is removed with high efficiency from any protein after translation in all eukaryotic cells. While the N-terminal methionine on most proteins also is efficiently removed in most prokaryotes, for some proteins, this prokaryotic removal process is inefficient, depending on the nature of the amino acid to which the N-terminal methionine is covalently linked.

Uses of the Polynucleotides

Each of the polynucleotides identified herein can be used in numerous ways as reagents. The following description should be considered exemplary and utilizes known techniques.

The polynucleotides of the present invention are useful for chromosome identification. There exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since few chromosome marking reagents, based on actual sequence data (repeat polymorphisms), are presently available. Each polynucleotide of the present invention can be used as a chromosome marker.

Briefly, sequences can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp) from the sequences shown in SEQ ID NO:1-62. Primers can be selected using computer analysis so that primers do not span more than one predicted exon in the genomic DNA. These primers are then used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the SEQ ID NO:1-62 will yield an amplified fragment.

Similarly, somatic hybrids provide a rapid method of PCR mapping the polynucleotides to particular chromosomes. Three or more clones can be assigned per day using a single thermal cycler. Moreover, sublocalization of the polynucleotides can be

WQ 00/77166

PCT/US00/15973

- 28 -

achieved with panels of specific chromosome fragments. Other gene mapping strategies that can be used include in situ hybridization, prescreening with labeled flow-sorted chromosomes, and prescreening by hybridization to construct chromosome specific cDNA libraries.

5

Precise chromosomal location of the polynucleotides can also be achieved using fluorescence in situ hybridization (FISH) of a metaphase chromosomal spread. This technique uses polynucleotides as short as 500 or 600 bases; however, polynucleotides 2,000-4,000 bp are preferred. For a review of this technique, see Verma et al., "Human

10 Chromosomes: a Manual of Basic Techniques." Pergamon Press, New York (1988).

For chromosome mapping, the polynucleotides can be used individually (to mark a single chromosome or a single site on that chromosome) or in panels (for marking multiple sites and/or multiple chromosomes). Preferred polynucleotides correspond to the noncoding regions of the cDNAs because the coding sequences are more likely conserved within gene families, thus increasing the chance of cross hybridization during chromosomal mapping.

15

Once a polynucleotide has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the polynucleotide can be used in linkage analysis. Linkage analysis establishes coinherence between a chromosomal location and presentation of a particular disease. (Disease mapping data are found, for example, in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available on line through Johns Hopkins University Welch Medical Library).) Assuming 1 megabase mapping resolution and one gene per 20 kb, a cDNA precisely localized to a chromosomal region associated with the disease could be one of 50-500 potential causative genes.

20

25

Thus, once coinherence is established, differences in the polynucleotide and the corresponding gene between affected and unaffected individuals can be examined. The polynucleotides of SEQ ID NO:1-62 can be used for this analysis of individual humans.

30

First, visible structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations, are examined in chromosome spreads or by PCR. If no structural alterations exist, the presence of point mutations are ascertained. Mutations observed in some or all affected individuals, but not in normal individuals, indicates that the mutation may cause the disease. However, complete sequencing of the polypeptide and the corresponding gene from

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 29 -

several normal individuals is required to distinguish the mutation from a polymorphism. If a new polymorphism is identified, this polymorphic polypeptide can be used for further linkage analysis.

5 Furthermore, increased or decreased expression of the gene in affected individuals as compared to unaffected individuals can be assessed using polynucleotides of the present invention. Any of these alterations (altered expression, chromosomal rearrangement, or mutation) can be used as a diagnostic or prognostic marker.

10 In addition to the foregoing, a polynucleotide can be used to control gene expression through triple helix formation or antisense DNA or RNA. Both methods rely on binding of the polynucleotide to DNA or RNA. For these techniques, preferred polynucleotides are usually 20 to 40 bases in length and complementary to either the region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res. 6:3073 (1979); Cooney et al.,
15 Science 241:456 (1988); and Dervan et al., Science 251:1360 (1991)) or to the mRNA itself (antisense - Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).) Triple helix formation optimally results in a shut-off of RNA transcription from DNA, while antisense RNA hybridization blocks translation of an mRNA molecule into polypeptide. Both techniques are
20 effective in model systems, and the information disclosed herein can be used to design antisense or triple helix polynucleotides in an effort to treat disease.

Polynucleotides of the present invention are also useful in gene therapy. One goal of gene therapy is to insert a normal gene into an organism having a defective gene, in an effort
25 to correct the genetic defect. The polynucleotides disclosed in the present invention offer a means of targeting such genetic defects in a highly accurate manner. Another goal is to insert a new gene that was not present in the host genome, thereby producing a new trait in the host cell.

30 The polynucleotides are also useful for identifying individuals from minute biological samples. The United States military, for example, is considering the use of restriction fragment length polymorphism (RFLP) for identification of its personnel. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identifying personnel. This method does not
35 suffer from the current limitations of "Dog Tags" which can be lost, switched, or stolen,

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 30 -

making positive identification difficult. The polynucleotides of the present invention can be used as additional DNA markers for RFLP.

5 The polynucleotides of the present invention can also be used as an alternative to RFLP, by determining the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. These sequences can be used to prepare PCR primers for amplifying and isolating such selected DNA, which can then be sequenced. Using this technique, individuals can be identified because each individual will have a unique set of DNA sequences. Once an unique ID database is established for an individual, positive
10 identification of that individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

Forensic biology also benefits from using DNA-based identification techniques as disclosed herein. DNA sequences taken from very small biological samples such as tissues,
15 e.g., hair or skin, or body fluids, e.g., blood, saliva, semen, etc., can be amplified using PCR. In one prior art technique, gene sequences amplified from polymorphic loci, such as DQa class II HLA gene, are used in forensic biology to identify individuals. (Erich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992).) Once these specific polymorphic loci are amplified, they are digested with one or more restriction enzymes, yielding an identifying set of bands
20 on a Southern blot probed with DNA corresponding to the DQa class II HLA gene. Similarly, polynucleotides of the present invention can be used as polymorphic markers for forensic purposes.

There is also a need for reagents capable of identifying the source of a particular
25 tissue. Such need arises, for example, in forensics when presented with tissue of unknown origin. Appropriate reagents can comprise, for example, DNA probes or primers specific to particular tissue prepared from the sequences of the present invention. Panels of such reagents can identify tissue by species and/or by organ type. In a similar fashion, these reagents can be used to screen tissue cultures for contamination.

30 In the very least, the polynucleotides of the present invention can be used as molecular weight markers on Southern gels, as diagnostic probes for the presence of a specific mRNA in a particular cell type, as a probe to "subtract-out" known sequences in the process of discovering novel polynucleotides, for selecting and making oligomers for
35 attachment to a "gene chip" or other support, to raise anti-DNA antibodies using DNA immunization techniques, and as an antigen to elicit an immune response.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 31 -

Uses of the Polypeptides

Each of the polypeptides identified herein can be used in numerous ways. The following description should be considered exemplary and utilizes known techniques.

5

A polypeptide of the present invention can be used to assay protein levels in a biological sample using antibody-based techniques. For example, protein expression in tissues can be studied with classical immunohistological methods. (Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987).)

10

Other antibody-based methods useful for detecting protein gene expression include immunoassays, such as the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the radioimmunoassay (RIA). Suitable antibody assay labels are known in the art and include enzyme labels, such as, glucose oxidase, and radioisotopes, such as iodine (^{125}I , ^{121}I), carbon (^{14}C), sulfur (^{35}S), tritium (^3H), indium (^{112}In), and technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), and fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, and biotin.

15

In addition to assaying secreted protein levels in a biological sample, proteins can also be detected *in vivo* by imaging. Antibody labels or markers for *in vivo* imaging of protein include those detectable by X-radiography, NMR or ESR. For X-radiography, suitable labels include radioisotopes such as barium or cesium, which emit detectable radiation but are not overtly harmful to the subject. Suitable markers for NMR and ESR include those with a detectable characteristic spin, such as deuterium, which may be incorporated into the antibody by labeling of nutrients for the relevant hybridoma.

20

25

A protein-specific antibody or antibody fragment which has been labeled with an appropriate detectable imaging moiety, such as a radioisotope (for example, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), a radio-opaque substance, or a material detectable by nuclear magnetic resonance, is introduced (for example, parenterally, subcutaneously, or intraperitoneally) into the mammal. It will be understood in the art that the size of the subject and the imaging system used will determine the quantity of imaging moiety needed to produce diagnostic images. In the case of a radioisotope moiety, for a human subject, the quantity of radioactivity injected will normally range from about 5 to 20 millicuries of $^{99\text{m}}\text{Tc}$. The labeled antibody or antibody fragment will then preferentially accumulate at the location of cells which contain the specific protein. *In vivo* tumor imaging is described in S.W. Burchiel et al.,

30

35

"Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 32 -

Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982.)

Thus, the invention provides a diagnostic method of a disorder, which involves (a)
5 assaying the expression of a polypeptide of the present invention in cells or body fluid of an individual; (b) comparing the level of gene expression with a standard gene expression level, whereby an increase or decrease in the assayed polypeptide gene expression level compared to the standard expression level is indicative of a disorder.

10 Moreover, polypeptides of the present invention can be used to treat disease.
For example, patients can be administered a polypeptide of the present invention in an effort to replace absent or decreased levels of the polypeptide (e.g., insulin), to supplement absent or decreased levels of a different polypeptide (e.g., hemoglobin S for hemoglobin B), to inhibit the activity of a polypeptide (e.g., an oncogene), to activate the activity of a
15 polypeptide (e.g., by binding to a receptor), to reduce the activity of a membrane bound receptor by competing with it for free ligand (e.g., soluble TNF receptors used in reducing inflammation), or to bring about a desired response (e.g., blood vessel growth).

Similarly, antibodies directed to a polypeptide of the present invention can also be
20 used to treat disease. For example, administration of an antibody directed to a polypeptide of the present invention can bind and reduce overproduction of the polypeptide. Similarly, administration of an antibody can activate the polypeptide, such as by binding to a polypeptide bound to a membrane (receptor).

25 At the very least, the polypeptides of the present invention can be used as molecular weight markers on SDS-PAGE gels or on molecular sieve gel filtration columns using methods well known to those of skill in the art. Polypeptides can also be used to raise antibodies, which in turn are used to measure protein expression from a recombinant cell, as a way of assessing transformation of the host cell. Moreover, the polypeptides of the present
30 invention can be used to test the following biological activities.

Biological Activities

The polynucleotides and polypeptides of the present invention can be used in assays
to test for one or more biological activities. If these polynucleotides and polypeptides do
35 exhibit activity in a particular assay, it is likely that these molecules may be involved in the

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 33 -

diseases associated with the biological activity. Thus, the polynucleotides and polypeptides could be used to treat the associated disease.

Immune Activity

- 5 A polypeptide or polynucleotide of the present invention may be useful in treating deficiencies or disorders of the immune system, by activating or inhibiting the proliferation, differentiation, or mobilization (chemotaxis) of immune cells. Immune cells develop through a process called hematopoiesis, producing myeloid (platelets, red blood cells, neutrophils, and macrophages) and lymphoid (B and T lymphocytes) cells from pluripotent stem cells.
- 10 The etiology of these immune deficiencies or disorders may be genetic, somatic, such as cancer or some autoimmune disorders, acquired (e.g., by chemotherapy or toxins), or infectious. Moreover, a polynucleotide or polypeptide of the present invention can be used as a marker or detector of a particular immune system disease or disorder.
- 15 A polynucleotide or polypeptide of the present invention may be useful in treating or detecting deficiencies or disorders of hematopoietic cells. A polypeptide or polynucleotide of the present invention could be used to increase differentiation and proliferation of hematopoietic cells, including the pluripotent stem cells, in an effort to treat those disorders associated with a decrease in certain (or many) types hematopoietic cells. Examples of
- 20 immunologic deficiency syndromes include, but are not limited to: blood protein disorders (e.g. agammaglobulinemia, dysgammaglobulinemia), ataxia telangiectasia, common variable immunodeficiency, DiGeorge Syndrome, HIV infection, HTLV-BLV infection, leukocyte adhesion deficiency syndrome, lymphopenia, phagocyte bactericidal dysfunction, severe combined immunodeficiency (SCIDs), Wiskott-Aldrich Disorder, anemia, thrombocytopenia,
- 25 or hemoglobinuria.
- Moreover, a polypeptide or polynucleotide of the present invention could also be used to modulate hemostatic (the stopping of bleeding) or thrombolytic activity (clot formation). For example, by increasing hemostatic or thrombolytic activity, a polynucleotide
- 30 or polypeptide of the present invention could be used to treat blood coagulation disorders (e.g., afibrinogenemia, factor deficiencies), blood platelet disorders (e.g. thrombocytopenia), or wounds resulting from trauma, surgery, or other causes. Alternatively, a polynucleotide or polypeptide of the present invention that can decrease hemostatic or thrombolytic activity could be used to inhibit or dissolve clotting. These molecules could be important in the
- 35 treatment of heart attacks (infarction), strokes, or scarring.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 34 -

A polynucleotide or polypeptide of the present invention may also be useful in treating or detecting autoimmune disorders. Many autoimmune disorders result from inappropriate recognition of self as foreign material by immune cells. This inappropriate recognition results in an immune response leading to the destruction of the host tissue.

- 5 Therefore, the administration of a polypeptide or polynucleotide of the present invention that inhibits an immune response, particularly the proliferation, differentiation, or chemotaxis of T-cells, may be an effective therapy in preventing autoimmune disorders.

- Examples of autoimmune disorders that can be treated or detected by the present invention include, but are not limited to: Addison's Disease, hemolytic anemia, antiphospholipid syndrome, rheumatoid arthritis, dermatitis, allergic encephalomyelitis, glomerulonephritis, Goodpasture's Syndrome, Graves' Disease, Multiple Sclerosis, Myasthenia Gravis, Neuritis, Ophthalmia, Bullous Pemphigoid, Pemphigus, Polyendocrinopathies, Purpura, Reiter's Disease, Stiff-Man Syndrome, Autoimmune
- 10 Thyroiditis, Systemic Lupus Erythematosus, Autoimmune Pulmonary Inflammation, Guillain-Barre Syndrome, insulin dependent diabetes mellitus, and autoimmune inflammatory eye disease.

- Similarly, allergic reactions and conditions, such as asthma (particularly allergic asthma) or other respiratory problems, may also be treated by a polypeptide or polynucleotide of the present invention. Moreover, these molecules can be used to treat anaphylaxis, hypersensitivity to an antigenic molecule, or blood group incompatibility.
- 20

- A polynucleotide or polypeptide of the present invention may also be used to treat and/or prevent organ rejection or graft-versus-host disease (GVHD). Organ rejection occurs by host immune cell destruction of the transplanted tissue through an immune response. Similarly, an immune response is also involved in GVHD, but, in this case, the foreign transplanted immune cells destroy the host tissues. The administration of a polypeptide or polynucleotide of the present invention that inhibits an immune response, particularly the proliferation, differentiation, or chemotaxis of T-cells, may be an effective therapy in preventing organ rejection or GVHD.
- 25
- 30

- Similarly, a polypeptide or polynucleotide of the present invention may also be used to modulate inflammation. For example, the polypeptide or polynucleotide may inhibit the proliferation and differentiation of cells involved in an inflammatory response. These molecules can be used to treat inflammatory conditions, both chronic and acute conditions,
- 35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 35 -

including inflammation associated with infection (e.g., septic shock, sepsis, or systemic inflammatory response syndrome (SIRS)), ischemia-reperfusion injury, endotoxin lethality, arthritis, complement-mediated hyperacute rejection, nephritis, cytokine or chemokine induced lung injury, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, or resulting from over

5 production of cytokines (e.g., TNF or IL-1.)

Hyperproliferative Disorders

A polypeptide or polynucleotide can be used to treat or detect hyperproliferative disorders, including neoplasms. A polypeptide or polynucleotide of the present invention

10 may inhibit the proliferation of the disorder through direct or indirect interactions. Alternatively, a polypeptide or polynucleotide of the present invention may proliferate other cells which can inhibit the hyperproliferative disorder.

For example, by increasing an immune response, particularly increasing antigenic

15 qualities of the hyperproliferative disorder or by proliferating, differentiating, or mobilizing T-cells, hyperproliferative disorders can be treated. This immune response may be increased by either enhancing an existing immune response, or by initiating a new immune response. Alternatively, decreasing an immune response may also be a method of treating hyperproliferative disorders, such as a chemotherapeutic agent.

20 Examples of hyperproliferative disorders that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide of the present invention include, but are not limited to neoplasms located in the: abdomen, bone, breast, digestive system, liver, pancreas, peritoneum, endocrine glands (adrenal, parathyroid, pituitary, testicles, ovary, thymus,

25 thyroid), eye, head and neck, nervous (central and peripheral), lymphatic system, pelvic, skin, soft tissue, spleen, thoracic, and urogenital.

Similarly, other hyperproliferative disorders can also be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide of the present invention. Examples of such hyperproliferative

30 disorders include, but are not limited to: hypergammaglobulinemia, lymphoproliferative disorders, paraproteinemias, purpura, sarcoidosis, Sezary Syndrome, Waldenström's Macroglobulinemia, Gaucher's Disease, histiocytosis, and any other hyperproliferative disease, besides neoplasia, located in an organ system listed above.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 36 -

Infectious Disease

A polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used to treat or detect infectious agents. For example, by increasing the immune response, particularly increasing the proliferation and differentiation of B and/or T cells, infectious diseases may be treated.

- 5 The immune response may be increased by either enhancing an existing immune response, or by initiating a new immune response. Alternatively, the polypeptide or polynucleotide of the present invention may also directly inhibit the infectious agent, without necessarily eliciting an immune response.

- 10 Viruses are one example of an infectious agent that can cause disease or symptoms that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide of the present invention. Examples of viruses, include, but are not limited to the following DNA and RNA viral families: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis),
 15 Herpesviridae (such as, Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Herpes Zoster), Mononegavirus (e.g., Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (e.g., Influenza), Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (such as Smallpox or Vaccinia), Reoviridae (e.g., Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I, HTLV-II, Lentivirus), and Togaviridae (e.g., Rubivirus). Viruses falling within these families can cause a variety of diseases or
 20 symptoms, including, but not limited to: arthritis, bronchiolitis, encephalitis, eye infections (e.g., conjunctivitis, keratitis), chronic fatigue syndrome, hepatitis (A, B, C, E, Chronic Active, Delta), meningitis, opportunistic infections (e.g., AIDS), pneumonia, Burkitt's Lymphoma, chickenpox, hemorrhagic fever, Measles, Mumps, Parainfluenza, Rabies, the common cold, Polio, leukemia, Rubella, sexually transmitted diseases, skin diseases (e.g.,
 25 Kaposi's, warts), and viremia. A polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used to treat or detect any of these symptoms or diseases.

- Similarly, bacterial or fungal agents that can cause disease or symptoms and that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide of the present invention include, but
 30 not limited to, the following Gram-Negative and Gram-positive bacterial families and fungi: Actinomycetales (e.g., Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia), Aspergillus, Bacillaceae (e.g., Anthrax, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia, Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatocycosis, Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella, Serratia, Yersinia),
 35 Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospirosis, Listeria, Mycoplasmatales, Neisseriaceae (e.g., Acinetobacter, Gonorrhea, Meningococcal), Pasteurellacea infections

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 37 -

(e.g., Actinobacillus, Haemophilus, Pasteurella), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Syphilis, and Staphylococcal. These bacterial or fungal families can cause the following diseases or symptoms, including, but not limited to: bacteremia, endocarditis, eye infections (conjunctivitis, tuberculosis, uveitis), gingivitis, opportunistic infections (e.g., AIDS related infections), paronychia, prosthesis-related infections, Reiter's Disease, respiratory tract infections, such as Whooping Cough or Empyema, sepsis, Lyme Disease, Cat-Scratch Disease, Dysentery, Paratyphoid Fever, food poisoning, Typhoid, pneumonia, Gonorrhea, meningitis, Chlamydia, Syphilis, Diphtheria, Leprosy, Paratuberculosis, Tuberculosis, Lupus, Botulism, gangrene, tetanus, impetigo, Rheumatic Fever, Scarlet Fever, sexually transmitted diseases, skin diseases (e.g., cellulitis, dermatocycoses), toxemia, urinary tract infections, wound infections. A polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used to treat or detect any of these symptoms or diseases.

Moreover, parasitic agents causing disease or symptoms that can be treated or detected by a polynucleotide or polypeptide of the present invention include, but not limited to, the following families: Amebiasis, Babesiosis, Coccidiosis, Cryptosporidiosis, Dientamoebiasis, Dourine, Ectoparasitic, Giardiasis, Helminthiasis, Leishmaniasis, Theileriasis, Toxoplasmosis, Trypanosomiasis, and Trichomonas. These parasites can cause a variety of diseases or symptoms, including, but not limited to: Scabies, Trombiculiasis, eye infections, intestinal disease (e.g., dysentery, giardiasis), liver disease, lung disease, opportunistic infections (e.g., AIDS related), Malaria, pregnancy complications, and toxoplasmosis. A polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used to treat or detect any of these symptoms or diseases.

Preferably, treatment using a polypeptide or polynucleotide of the present invention could either be by administering an effective amount of a polypeptide to the patient, or by removing cells from the patient, supplying the cells with a polynucleotide of the present invention, and returning the engineered cells to the patient (ex vivo therapy). Moreover, the polypeptide or polynucleotide of the present invention can be used as an antigen in a vaccine to raise an immune response against infectious disease.

Regeneration

A polynucleotide or polypeptide of the present invention can be used to differentiate, proliferate, and attract cells, leading to the regeneration of tissues. (See, Science 276:59-87 (1997).) The regeneration of tissues could be used to repair, replace, or protect tissue damaged by congenital defects, trauma (wounds, burns, incisions, or ulcers), age, disease

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 38 -

(e.g. osteoporosis, osteoarthritis, periodontal disease, liver failure), surgery, including cosmetic plastic surgery, fibrosis, reperfusion injury, or systemic cytokine damage.

5 Tissues that could be regenerated using the present invention include organs (e.g., pancreas, liver, intestine, kidney, skin, endothelium), muscle (smooth, skeletal or cardiac), vascular (including vascular endothelium), nervous, hematopoietic, and skeletal (bone, cartilage, tendon, and ligament) tissue. Preferably, regeneration occurs without or decreased scarring. Regeneration also may include angiogenesis.

10 Moreover, a polynucleotide or polypeptide of the present invention may increase regeneration of tissues difficult to heal. For example, increased tendon/ligament regeneration would quicken recovery time after damage. A polynucleotide or polypeptide of the present invention could also be used prophylactically in an effort to avoid damage. Specific diseases
15 that could be treated include of tendinitis, carpal tunnel syndrome, and other tendon or ligament defects. A further example of tissue regeneration of non-healing wounds includes pressure ulcers, ulcers associated with vascular insufficiency, surgical, and traumatic wounds.

Similarly, nerve and brain tissue could also be regenerated by using a polynucleotide or polypeptide of the present invention to proliferate and differentiate nerve cells. Diseases
20 that could be treated using this method include central and peripheral nervous system diseases, neuropathies, or mechanical and traumatic disorders (e.g., spinal cord disorders, head trauma, cerebrovascular disease, and stroke). Specifically, diseases associated with peripheral nerve injuries, peripheral neuropathy (e.g., resulting from chemotherapy or other medical therapies), localized neuropathies, and central nervous system diseases (e.g.,
25 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Shy-Drager syndrome), could all be treated using the polynucleotide or polypeptide of the present invention.

30 Chemotaxis

A polynucleotide or polypeptide of the present invention may have chemotaxis activity. A chemotactic molecule attracts or mobilizes cells (e.g., monocytes, fibroblasts, neutrophils, T-cells, mast cells, eosinophils, epithelial and/or endothelial cells) to a particular
35 site in the body, such as inflammation, infection, or site of hyperproliferation. The mobilized cells can then fight off and/or heal the particular trauma or abnormality.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 39 -

A polynucleotide or polypeptide of the present invention may increase chemotactic activity of particular cells. These chemotactic molecules can then be used to treat inflammation, infection, hyperproliferative disorders, or any immune system disorder by increasing the number of cells targeted to a particular location in the body. For example, chemotactic molecules can be used to treat wounds and other trauma to tissues by attracting immune cells to the injured location. Chemotactic molecules of the present invention can also attract fibroblasts, which can be used to treat wounds.

It is also contemplated that a polynucleotide or polypeptide of the present invention may inhibit chemotactic activity. These molecules could also be used to treat disorders. Thus, a polynucleotide or polypeptide of the present invention could be used as an inhibitor of chemotaxis.

Binding Activity

A polypeptide of the present invention may be used to screen for molecules that bind to the polypeptide or for molecules to which the polypeptide binds. The binding of the polypeptide and the molecule may activate (agonist), increase, inhibit (antagonist), or decrease activity of the polypeptide or the molecule bound. Examples of such molecules include antibodies, oligonucleotides, proteins (e.g., receptors), or small molecules.

Preferably, the molecule is closely related to the natural ligand of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligand, or a natural substrate, a ligand, a structural or functional mimetic. (See, Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2), Chapter 5 (1991).) Similarly, the molecule can be closely related to the natural receptor to which the polypeptide binds, or at least, a fragment of the receptor capable of being bound by the polypeptide (e.g., active site). In either case, the molecule can be rationally designed using known techniques.

Preferably, the screening for these molecules involves producing appropriate cells which express the polypeptide, either as a secreted protein or on the cell membrane. Preferred cells include cells from mammals, yeast, *Drosophila*, or *E. coli*. Cells expressing the polypeptide (or cell membrane containing the expressed polypeptide) are then preferably contacted with a test compound potentially containing the molecule to observe binding, stimulation, or inhibition of activity of either the polypeptide or the molecule.

The assay may simply test binding of a candidate compound to the polypeptide, wherein binding is detected by a label, or in an assay involving competition with a labeled

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 40 -

competitor. Further, the assay may test whether the candidate compound results in a signal generated by binding to the polypeptide.

Alternatively, the assay can be carried out using cell-free preparations, polypeptide/molecule affixed to a solid support, chemical libraries, or natural product mixtures. The assay may also simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide, measuring polypeptide/molecule activity or binding, and comparing the polypeptide/molecule activity or binding to a standard.

Preferably, an ELISA assay can measure polypeptide level or activity in a sample (e.g., biological sample) using a monoclonal or polyclonal antibody. The antibody can measure polypeptide level or activity by either binding, directly or indirectly, to the polypeptide or by competing with the polypeptide for a substrate.

All of these above assays can be used as diagnostic or prognostic markers. The molecules discovered using these assays can be used to treat disease or to bring about a particular result in a patient (e.g., blood vessel growth) by activating or inhibiting the polypeptide/molecule. Moreover, the assays can discover agents which may inhibit or enhance the production of the polypeptide from suitably manipulated cells or tissues.

Therefore, the invention includes a method of identifying compounds which bind to a polypeptide of the invention comprising the steps of: (a) incubating a candidate binding compound with a polypeptide of the invention; and (b) determining if binding has occurred. Moreover, the invention includes a method of identifying agonists/antagonists comprising the steps of: (a) incubating a candidate compound with a polypeptide of the invention, (b) assaying a biological activity, and (c) determining if a biological activity of the polypeptide has been altered.

Other Activities

A polypeptide or polynucleotide of the present invention may also increase or decrease the differentiation or proliferation of embryonic stem cells, besides, as discussed above, hematopoietic lineage.

A polypeptide or polynucleotide of the present invention may also be used to modulate mammalian characteristics, such as body height, weight, hair color, eye color, skin,

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 41 -

percentage of adipose tissue, pigmentation, size, and shape (e.g., cosmetic surgery). Similarly, a polypeptide or polynucleotide of the present invention may be used to modulate mammalian metabolism affecting catabolism, anabolism, processing, utilization, and storage of energy.

5

A polypeptide or polynucleotide of the present invention may be used to change a mammal's mental state or physical state by influencing biorhythms, circadian rhythms, depression (including depressive disorders), tendency for violence, tolerance for pain, reproductive capabilities (preferably by activin or inhibin-like activity), hormonal or endocrine levels, appetite, libido, memory, stress, or other cognitive qualities.

10

A polypeptide or polynucleotide of the present invention may also be used as a food additive or preservative, such as to increase or decrease storage capabilities, fat content, lipid, protein, carbohydrate, vitamins, minerals, cofactors or other nutritional components.

15

Other Preferred Embodiments

Other preferred embodiments of the claimed invention include an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 80%, preferably at least 85%, more preferably at least 90%, most preferably at least 95% identical to a sequence of at least about 50 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

20

Also preferred is a nucleic acid molecule wherein said sequence of contiguous nucleotides is included in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62 in the range of positions beginning with the nucleotide at about the position of the 5' nucleotide of the clone sequence and ending with the nucleotide at about the position of the 3' nucleotide of the clone sequence.

25

Also preferred is a nucleic acid molecule wherein said sequence of contiguous nucleotides is included in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62 in the range of positions beginning with the nucleotide at about the position of the 5' nucleotide of the start codon and ending with the nucleotide at about the position of the 3' nucleotide of the clone sequence as defined for SEQ ID NO:1-62.

30

Similarly preferred is a nucleic acid molecule wherein said sequence of contiguous nucleotides is included in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62 in the range of positions beginning with the nucleotide at about the position of the 5' nucleotide of the first

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 42 -

amino acid of the signal peptide and ending with the nucleotide at about the position of the 3' nucleotide of the clone sequence as defined for SEQ ID NO:1-62.

5 Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least about 150 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

10 Further preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least about 500 contiguous nucleotides in the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

15 A further preferred embodiment is a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62 beginning with the nucleotide at about the position of the 5' nucleotide of the first amino acid of the signal peptide and ending with the nucleotide at about the position of the 3' nucleotide of the clone sequence as defined for SEQ ID NO:1-62.

20 A further preferred embodiment is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to the complete nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

25 Also preferred is an isolated nucleic acid molecule which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule, wherein said nucleic acid molecule which hybridizes does not hybridize under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence consisting of only A residues or of only T residues.

30 A further preferred embodiment is a method for detecting in a biological sample a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62, which method comprises a step of comparing a nucleotide sequence of at least one nucleic acid molecule in said sample with a sequence selected from said group and determining whether the sequence of said nucleic acid molecule in said sample is at least 95% identical to said selected sequence.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 43 -

Also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences comprises determining the extent of nucleic acid hybridization between nucleic acid molecules in said sample and a nucleic acid molecule comprising said sequence selected from said group. Similarly, also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences is performed by comparing the nucleotide sequence determined from a nucleic acid molecule in said sample with said sequence selected from said group. The nucleic acid molecules can comprise DNA molecules or RNA molecules.

A further preferred embodiment is a method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample which method comprises a step of detecting nucleic acid molecules in said sample, if any, comprising a nucleotide sequence that is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

Also preferred is a method for diagnosing in a subject a pathological condition associated with abnormal structure or expression of a gene, which method comprises a step of detecting in a biological sample obtained from said subject nucleic acid molecules, if any, comprising a nucleotide sequence that is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62.

The method for diagnosing a pathological condition can comprise a step of detecting nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence in a panel of at least two nucleotide sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from said group.

Also preferred is a composition of matter comprising isolated nucleic acid molecules wherein the nucleotide sequences of said nucleic acid molecules comprise a panel of at least two nucleotide sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 95% identical to a sequence of at least 50 contiguous nucleotides in a sequence selected from the group consisting of: a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1-62. The nucleic acid molecules can comprise DNA molecules or RNA molecules.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 90% identical to a sequence of at least about 10 contiguous amino acids in an amino acid sequence translated from SEQ ID NO:1-62.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 44 -

Also preferred is a polypeptide, wherein said sequence of contiguous amino acids is included in acids in an amino acid sequence translated from SEQ ID NO:1-62, in the range of positions beginning with the residue at about the position of the first amino acid of the secreted portion and ending with the residue at about the last amino acid of the open reading frame.

Also preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 30 contiguous amino acids in an amino acid sequence translated from SEQ ID NO:1-62.

Further preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to a sequence of at least about 100 contiguous amino acids in an amino acid sequence translated from SEQ ID NO:1-62.

Further preferred is an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence at least 95% identical to acids in an amino acid sequence translated from SEQ ID NO:1-62.

Further preferred is a method for detecting in a biological sample a polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62, which method comprises a step of comparing an amino acid sequence of at least one polypeptide molecule in said sample with a sequence selected from said group and determining whether the sequence of said polypeptide molecule in said sample is at least 90% identical to said sequence of at least 10 contiguous amino acids.

Also preferred is the above method wherein said step of comparing an amino acid sequence of at least one polypeptide molecule in said sample with a sequence selected from said group comprises determining the extent of specific binding of polypeptides in said sample to an antibody which binds specifically to a polypeptide comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 45 -

Also preferred is the above method wherein said step of comparing sequences is performed by comparing the amino acid sequence determined from a polypeptide molecule in said sample with said sequence selected from said group.

5 Also preferred is a method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample which method comprises a step of detecting polypeptide molecules in said sample, if any, comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62.

10

Also preferred is the above method for identifying the species, tissue or cell type of a biological sample, which method comprises a step of detecting polypeptide molecules comprising an amino acid sequence in a panel of at least two amino acid sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the above group.

15

Also preferred is a method for diagnosing in a subject a pathological condition associated with abnormal structure or expression of a gene, which method comprises a step of detecting in a biological sample obtained from said subject polypeptide molecules comprising an amino acid sequence in a panel of at least two amino acid sequences, wherein at least one sequence in said panel is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62.

20

25 In any of these methods, the step of detecting said polypeptide molecules includes using an antibody.

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which is at least 95% identical to a nucleotide sequence encoding a polypeptide wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to a sequence of at least 10 contiguous amino acids in a sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62.

30

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule, wherein said nucleotide sequence encoding a polypeptide has been optimized for expression of said polypeptide in a prokaryotic host.

35

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 46 -

Also preferred is an isolated nucleic acid molecule, wherein said nucleotide sequence encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62.

5

Further preferred is a method of making a recombinant vector comprising inserting any of the above isolated nucleic acid molecule into a vector. Also preferred is the recombinant vector produced by this method. Also preferred is a method of making a recombinant host cell comprising introducing the vector into a host cell, as well as the recombinant host cell produced by this method.

10

Also preferred is a method of making an isolated polypeptide comprising culturing this recombinant host cell under conditions such that said polypeptide is expressed and recovering said polypeptide. Also preferred is this method of making an isolated polypeptide, wherein said recombinant host cell is a eukaryotic cell and said polypeptide is a secreted portion of a human secreted protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of amino acid sequences translated from SEQ ID NO:1-62. The isolated polypeptide produced by this method is also preferred.

15

Also preferred is a method of treatment of an individual in need of an increased level of a secreted protein activity, which method comprises administering to such an individual a pharmaceutical composition comprising an amount of an isolated polypeptide, polynucleotide, or antibody of the claimed invention effective to increase the level of said protein activity in said individual.

20

25

Having generally described the invention, the same will be more readily understood by reference to the following examples, which are provided by way of illustration and are not intended as limiting.

30

EXAMPLE 1

Identification and Characterization of Polynucleotides Regulated by *in vivo* DSS Treatment

35

For the induction of colitis, DSS (MW 40,000) is dissolved in the drinking water and given to mice *ad libitum* for a period of 7 days. The DSS water is then replaced with regular drinking water. Distinct mouse strains demonstrate differential susceptibility to DSS-colitis.

WO 00/77166

PCT/US99/15973

- 47 -

Three percent DSS is sufficient for the induction of acute colitis in C57BL/6 mice, whereas 5% DSS is required for the induction of acute colitis in BALB/c mice.

For the purpose of this study, samples of colon were harvested from cohorts of C57BL/6 mice treated with 3% DSS. Tissues were harvested at day 0, day 4, day 8 or day 12 - a schedule designed to encompass the full range of induction of intestinal damage through recovery.

Damage to colonic tissue is a hallmark of IBD. The mouse model of DSS-induced colitis gives rise to damaged colonic tissue and as such it is one of the more useful models for studying IBD.

Mice were treated with DSS in their drinking water as described above. At various intervals during DSS-treatment, cohorts of mice were sacrificed and the colons removed by dissection. Freshly dissected colonic tissue was immediately placed in GT buffer (4.5M guanidinium isothiocyanate, 50mM sodium citrate, 0.5%w/v sodium sarcosyl, 2% 2-beta-mercaptoethanol) and homogenized. Homogenized lysates were spun briefly to remove large debris before being layered onto a CsCl gradient. RNA was extracted using conventional methods and was subsequently used for TOGA analysis.

Features of DSS-induced colitis

Weight loss is apparent in mice beginning at day 4. Histological analysis of the intestine reveals the presence of early patchy lesions identifiable by the loss of epithelial cells and goblet cells. By day 8, weight loss is fairly severe (approximately 20% reduction) and the mice appear moribund. Histologically, the gut epithelium is almost totally destroyed at this stage. There is evidence of a large mixed inflammatory cell infiltration into the lamina propria and submucosa. The inflammatory cell infiltrate appears to be composed primarily of T cells, B cells and granulocytes. By day 12, weight gain is apparent as the mice recover. At this later stage, crypt recovery and epithelial regeneration provide histological evidence of the beginning of repair processes.

Isolated RNA was analyzed using a method of simultaneous sequence-specific identification of mRNAs known as TOGA (TOtal Gene expression Analysis) described in Sutcliffe, J.G., et al *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Feb 29; 97(5):1976-1981, International published application PCT/US99/23655, U.S. Patent No. 5,459,037, U.S. Patent No. 5,807,680, and U.S. Patent No. 6,030,784, hereby incorporated herein by reference. Preferably, prior to the application of the TOGA method or other methods, the isolated RNA

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 48 -

was enriched to form a starting polyA-containing mRNA population by methods known in the art. In such a preferred embodiment, the TOGA method further comprises an additional Polymerase Chain Reaction ("PCR") step performed using one of four 5' PCR primers and cDNA templates prepared from a population of antisense complementary RNA ("cRNAs").

- 5 A final PCR step using one of a possible 256 5' PCR primers and a universal 3' PCR primer produced as PCR products, cDNA fragments that corresponded to a 3'-region of the starting mRNA population. The produced PCR products were then identified by a) the sequence of at least the 5' seven base pairs, preferably the sequence of the entire fragment, and b) the length of the fragment. These two parameters, sequence and fragment length, were used to compare
- 10 the obtained PCR products to a database of known polynucleotide sequences.

- The method yields Digital Sequence Tags (DSTs), that is, polynucleotides that are expressed sequence tags (ESTs) of the 3' end of mRNAs. DSTs that showed changes in relative levels following DSS treatment were selected for further study. The intensities of the
- 15 laser-induced fluorescence of the labeled PCR products were compared across sample isolated at different time intervals after treatment.

- In general, double-stranded cDNA is generated from poly(A)-enriched cytoplasmic RNA extracted from the tissue samples of interest using an equimolar mixture of all 48 5'-
- 20 biotinylated anchor primers of a set to initiate reverse transcription. One such suitable set is G-A-A-T-T-C-A-A-C-T-G-G-A-A-G-C-G-G-C-C-G-C-A-G-G-A-A-T-V-N-N (SEQ ID NO: 63), where V is A, C or G and N is A, C, G or T. One member of this mixture of 48 anchor primers initiates synthesis at a fixed position at the 3' end of all copies of each mRNA species in the sample, thereby defining a 3' endpoint for
- 25 each species, resulting in biotinylated double stranded cDNA.

- Each biotinylated double stranded cDNA sample was cleaved with the restriction endonuclease MspI, which recognizes the sequence CCGG. The 3' fragments of cDNA were then isolated by capture of the biotinylated cDNA fragments on a streptavidin-coated
- 30 substrate. Suitable streptavidin-coated substrates include microtitre plates, PCR tubes, polystyrene beads, paramagnetic polymer beads and paramagnetic porous glass particles. A preferred streptavidin-coated substrate is a suspension of paramagnetic polymer beads (Dyna[®] Inc., Lake Success, NY).

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 49 -

After washing the streptavidin-coated substrate and captured biotinylated cDNA fragments, the cDNA fragment product was released by digestion with NotI, which cleaves at an 8-nucleotide sequence within the anchor primers but rarely within the mRNA-derived

5 portion of the cDNAs. The 3' MspI-NotI fragments, which are of uniform length for each mRNA species, were directionally ligated into Clal-, NotI-cleaved plasmid pBC SK⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) in an antisense orientation with respect to the vector's T3 promoter, and the product used to transform Escherichia coli SURE cells (Stratagene). The ligation regenerates the NotI site, but not the MspI site. Each library contained in excess of 5

10 x 10⁶ recombinants to ensure a high likelihood that the 3' ends of all mRNAs with concentrations of 0.001% or greater were multiply represented. Plasmid preps (Qiagen) were made from the cDNA library of each sample under study.

An aliquot of each library was digested with MspI, which effects linearization by

15 cleavage at several sites within the parent vector while leaving the 3' cDNA inserts and their flanking sequences, including the T3 promoter, intact. The product was incubated with T3 RNA polymerase (MEGAscript kit, Ambion) to generate antisense cRNA transcripts of the cloned inserts containing known vector sequences abutting the MspI and NotI sites from the original cDNAs.

20 At this stage, each of the cRNA preparations was processed in a three-step fashion. In step one, 250 ng of cRNA was converted to first-strand cDNA using the 5' RT primer (A-G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G, (SEQ ID NO: 64). In step two, 400 pg of cDNA product was used as PCR template in four separate reactions with each of the four 5' PCR primers of

25 the form G-G-T-C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N (SEQ ID NO: 65), each paired with a "universal" 3' PCR primer G-A-G-C-T-C-C-A-C-C-G-C-G-G-T (SEQ ID NO: 66).

In step three, the product of each subpool was further divided into 64 subsubpools (2ng in 20μl) for the second PCR reaction, with 100 ng each of the fluoresceinated "universal"

30 3' PCR primer, the oligonucleotide (SEQ ID NO: 66) conjugated to 6-FAM and the appropriate 5' PCR primer of the form C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-N-N-N (SEQ ID NO: 67), using a program that included an annealing step at a temperature X slightly above the T_m of each 5' PCR primer to minimize artifactual mispriming and promote high fidelity copying.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 50 -

Each polymerase chain reaction step was performed in the presence of TaqStart antibody (Clontech).

The products from the final polymerase chain reaction step for each of the tissue samples were resolved on a series of denaturing DNA sequencing gels using the automated ABI Prism 377 sequencer. Data were collected using the GeneScan software package (ABI) and normalized for amplitude and migration. Complete execution of this series of reactions generated 64 product subpools for each of the four pools established by the 5' PCR primers of the first PCR reaction, for a total of 256 product subpools for the entire 5' PCR primer set of the second PCR reaction.

The mRNA samples from each timepoint after DSS treatment as described above were analyzed. Table 1 is a summary of the expression levels of 414 mRNAs determined from cDNA. These cDNA molecules are identified by their digital address, that is, a partial 5' terminus nucleotide sequence coupled with the length of the molecule, as well as the relative amount of the molecule produced at different time intervals after treatment. The 5' terminus partial nucleotide sequence is determined by the recognition site for *MspI* and the nucleotide sequence of the parsing bases of the 5' PCR primer used in the final PCR step. The digital address length of the fragment was determined by interpolation on a standard curve and, as such, may vary $\pm$ 1-2 b.p. from the actual length as determined by sequencing.

For example, the entry in Table 1 that describes a DNA molecule identified by the digital address *MspI* AGTG 244, is further characterized as having a 5' terminus partial nucleotide sequence of CCGAGTG and a digital address length of 244 b.p. The DNA molecule identified as *MspI* AGTG 244 is further described as being expressed at increasing levels at days 0, 4 and 8 with a moderate decline at day 12. However, the treatment results in a different pattern of expression of *MspI* AGTA 187, which declines on days 4 and 8 from the relatively high level seen at day 0, but increases at day 12.

Similarly, the other 412 DNA molecules identified in Table 1 by their *MspI* digital addresses are further characterized by the pattern of the level of gene expression on days 0, 4, 8 and 12 following the end of the DSS treatment. Many of the isolated clones were further

WO 01/77166

PCT/US00/15973

- 51 -

characterized in Tables 2 and 3. Their nucleotide sequences are provided as SEQ ID NO:1-62 in the Sequence Listing below.

- The data shown in Figure 1 were generated with a 5'-PCR primer (C-G-A-C-G-G-T-A-T-C-G-G-C-G, SEQ ID NO: 68) paired with the "universal" 3' primer (SEQ ID NO: 66) labeled with 6-carboxyfluorescein (6FAM, ABI) at the 5' terminus. PCR reaction products were resolved by gel electrophoresis on 4.5% acrylamide gels and fluorescence data acquired on ABI377 automated sequencers. Data were analyzed using GeneScan software (Perkin-Elmer).
- The results of TOGA analysis using a 5' PCR primer with parsing bases CGCG (SEQ ID NO: 68) are shown in Figure 1, which presents the results of TOGA analysis using a 5' PCR primer with parsing bases CGCG, showing PCR products produced from mRNA extracted from (top to bottom panels) colons isolated from mice 0 (Figure 1A), 4 (Figure 1B), 8 (Figure 1C) or 12 days (Figure 1D) after a seven day course of treatment with DSS. The vertical index line indicates a PCR product of about 458 b.p. that is present on day 0, reduced on day 4, much increased on day 8 and whose expression relatively decreases but is still elevated on day 12.
- Some products, which were also differentially represented, appeared to migrate in positions that suggest that the products were novel based on comparison to data extracted from GenBank. In these cases, the PCR product was isolated, cloned into a TOPO vector (Invitrogen) and sequenced on both strands. Examples are found in Table 4, below. In order to verify that the clones isolated are from the same peak, PCR primers were designed based on the determined sequence and PCR was performed using the cDNA produced in the first PCR reaction as substrate. For example, for the 458 b.p. product disclosed above, oligonucleotides were synthesized using the universal 3' PCR primer and a 5' PCR primer corresponding to the 5' PCR primer in the second PCR step extended at the 3' end with additional nucleotides from the clone sequence 3' to the parsing bases (in this case, CGCG). This extended 5' PCR primer had the sequence: GATCGAATCC GGCGCGCAGG GGGACCAGAC (SEQ ID NO: 78).

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 52 -

The products were separated by electrophoresis and the length of the clone was compared to the length of the original PCR product as shown in Figure 2. Figure 2A shows the length (as peak position) of the PCR product derived as described above. Figure 2B shows the PCR products produced using the original PCR primers. SEQ ID NO: 68 and SEQ ID NO: 66 (compare to Figure 1A). In Figure 2C, the traces from the top and middle panels are overlaid, demonstrating that the PCR product using the sequence of the isolated clone is the same length as the original PCR product.

The same procedure was used to verify candidate matches to database entries. The results are shown in Table 4, below. In each case, oligonucleotides were synthesized using the universal 3' PCR primer and a 5' PCR primer corresponding to the 5' PCR primer in the second PCR step extended at the 3' end with additional nucleotides from the sequences adjacent to the terminal *Msp*I sites in the identified corresponding GenBank sequences. In three cases (IMX2_33, SEQ ID NO:21, IMX2_34, SEQ ID NO:61 and IMX2_70, SEQ ID NO:62) the DST sequence listed was obtained from the verified database match sequence in GenBank.

Figure 3 is a graphical representation of the results of Northern Blot analysis of clone IMX 2_46, SEQ ID NO: 10, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the four experimental samples (0, 4, 8 or 12 days post-treatment) as well as size standards was blotted after electrophoresis and probed with radiolabelled IMX 2_46, SEQ ID NO: 10, imaged using a phosphorimager and quantified. Quantitative results showing the relative expression levels of the 1.6 kb transcript were: 0 day, 64; 4 days, 53; 8 days, 223; and 12 days, 269. The amount of RNA loaded on the gel was determined by probing for cyclophilin ("cyc").

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 53 -

TABLE 1							
Seq ID	Clone ID	Digital Address (Msp1)	0 Days	4 Days	8 Days	12 Days	
		AAAA 157	405	247	181	459	
		AAAA 316	42	34	47	174	
51	IMX2_65	AAAC 186	3722	1457	4314	5810	
50	IMX2_1	AAAC 407	95	106	345	281	
		AAAG 449	214	121	249	299	
		ACCA 377	84	50	197	107	
59	IMX2_2	AACG 299	79	108	366	91	
		AATC 318	326	174	36	72	
60	IMX2_3	AATG 114	210	136	1059	514	
		ACAA 227	110	496	1568	564	
		ACAA 381	51	57	120	69	
		ACAC 283	131	69	212	143	
1	IMX2_4	ACAC 320	28	38	284	106	
26	IMX2_5	ACAC 398	29	37	94	70	
		ACAG 288	69	67	264	101	
		ACAT 335	767	362	231	449	
		ACCA 359	652	134	227	452	
		ACCC 493	128	332	316	398	
		ACCG 387	218	60	149	570	
		ACCT 225	851	189	650	1106	
27	IMX2_6	ACCT 364	173	92	530	142	
		ACGA 171	761	192	909	790	
		ACGA 206	618	984	2071	1168	
		ACGA 235	623	489	1511	1276	
		ACGA 326	514	1217	805	722	
		ACGC 361	455	97	227	299	
		ACGG 198	1483	2094	5210	3294	
52	IMX2_66	ACGG 238	1576	537	1476	1734	
		ACGG 409	405	172	473	800	
		ACGG 449	1021	66	69	152	
		ACGT 174	743	401	265	615	
		ACTA 333	555	181	305	468	
		ACTC 111	468	488	1773	1095	
28	IMX2_7	ACTC 171	55	242	1326	651	
		ACTG 184	1889	742	596	924	
		ACTG 319	67	130	22	91	
		ACTT 292	51	39	180	177	
		AGAA 104	325	215	319	546	
		AGAA 263	423	840	1050	1197	
		AGAC 487	1568	826	354	1594	
		AGAG 110	1692	2388	3206	1620	
		AGAG 205	710	300	547	453	

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 54 -

		AGAG	318	283	166	139	452
		AGAG	329	300	125	234	400
		AGAG	372	158	94	193	272
		AGCA	251	1125	353	659	1187
29	IMX2_8	AGCA	285	314	2300	1575	1050
		AGCA	316	158	656	179	174
		AGCC	379	439	148	366	544
		AGCG	258	278	176	543	239
		AGCG	284	163	39	25	87
		AGCG	396	476	57	261	605
		AGCT	175	920	1790	1538	1268
		AGCT	230	179	192	33	132
		AGGA	163	691	924	1919	830
		AGGA	190	1099	473	638	791
		AGGA	266	354	106	74	133
		AGGA	332	63	192	130	58
		AGGA	381	20	88	49	33
		AGGC	367	599	165	273	723
		AGGC	410	4628	1660	5080	4468
		AGGT	101	316	524	211	133
		AGGT	282	169	55	30	64
		AGGT	304	47	33	39	133
		AGGT	485	403	181	292	421
		AGTA	187	1331	412	457	753
		AGTA	209	194	331	365	412
		AGTA	285	62	257	269	164
		AGTC	288	101	354	197	163
		AGTC	324	665	319	66	112
30	IMX2_11	AGTC	476	51	150	661	373
31	IMX2_12	AGTG	244	165	338	2558	1077
		AGTT	101	92	235	234	70
		AGTT	248	70	164	303	124
		ATAA	170	410	116	241	315
41	IMX2_39	ATAA	226	38	44	174	69
		ATAA	261	485	282	891	766
32	IMX2_13	ATAC	226	174	303	598	221
		ATAC	275	954	756	1600	1133
		ATAG	110	4836	1250	1558	3142
		ATAG	151	1774	630	919	1402
		ATAG	223	513	584	1488	1078
		ATAG	323	1044	599	1180	1349
		ATAG	403	187	79	110	225
		ATCA	87	1018	1221	1588	664
		ATCA	121	671	263	160	314
		ATCA	466	376	150	251	298
		ATCC	224	89	175	382	232
		ATCC	304	489	245	553	537

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 55 -

		ATCC	347	229	106	283	291
		ATCC	451	309	112	187	295
		ATCG	137	399	111	147	135
		ATCG	205	67	240	341	76
		ATCG	362	61	44	165	94
		ATCG	464	393	139	330	394
		ATCT	392	208	72	123	236
		ATGA	203	743	1154	1968	1196
		ATGA	275	425	255	680	395
		ATGA	286	460	167	143	330
		ATGC	126	1310	551	609	711
		ATGG	196	284	470	636	361
		ATGG	349	481	588	178	439
		ATTA	105	432	233	67	94
		ATTA	162	568	201	235	399
		ATTA	263	104	48	51	69
		ATTG	140	1744	870	1490	2200
		CAAA	267	94	77	244	127
		CAAA	310	405	145	404	441
		CAAA	359	1777	461	594	1572
		CAAC	267	868	129	357	710
		CAAC	338	469	131	342	468
		CAAC	347	378	174	230	486
		CAAC	362	289	125	620	369
		CAAG	464	162	42	112	198
		CAAG	479	87	42	59	105
		CAAT	132	983	727	1005	1669
		CAAT	188	2436	1137	2640	3409
		CAAT	279	374	449	123	377
		CAAT	311	108	102	41	110
		CACA	392	150	55	41	137
		CACC	86	682	1597	1849	916
		CACC	360	85	92	280	89
		CACC	386	242	65	133	222
		CACC	394	45	47	135	39
		CACG	92	2188	4464	5216	2074
		CAGA	276	43	49	145	129
		CAGC	116	3026	6760	2728	3430
		CAGG	315	299	84	145	335
		CAGG	421	55	79	185	163
		CATC	162	1182	2890	1216	1262
		CATC	334	389	332	196	702
		CATC	368	176	57	103	162
		CATG	257	532	157	326	468
		CATG	353	2449	3211	1050	1948
42	IMX2_40	CATT	90	299	2530	3750	823
		CATT	331	52	127	194	33

WD 09/77166

PCT/US00/15973

- 56 -

		CATT	347	449	72	261	393
		CCAA	126	2480	589	976	1713
		CCAA	166	1119	1451	960	545
43	IMX2_42	CCAA	201	242	1101	645	304
8	IMX2_43	CCAA	272	70	439	261	75
		CCAA	309	319	87	203	458
		CCAA	344	185	1389	992	201
		CCAC	178	85	295	222	122
		CCAC	248	1237	3609	891	1472
		CCAC	291	345	141	179	291
		CCAC	354	198	95	47	189
		CCAG	274	238	112	165	248
		CCAG	424	181	69	94	167
		CCAT	85	160	192	198	80
		CCAT	141	265	613	424	447
		CCAT	177	6480	4379	1011	1817
		CCCA	78	1043	1200	2301	1018
		CCCA	220	1438	773	454	463
		CCCA	255	29	27	23	79
		CCCG	102	2353	1931	3666	4085
		CCCG	211	1290	512	169	678
13	IMX2_55	CCCG	473	3711	1320	23	34
		CCCT	314	430	222	154	171
		CCCT	462	46	138	57	65
		CCGA	188	536	1180	948	647
		CCGA	207	297	803	357	340
		CCGC	114	1184	515	251	817
		CCGC	257	206	135	77	82
53	IMX2_68A	CCGC	266	286	77	289	435
54	IMX2_68B	CCGC	266	286	77	289	435
		CCGC	496	78	29	95	77
55	IMX2_69	CCGT	151	1603	264	440	1074
		CCGT	177	2085	836	411	338
		CCGT	214	1054	2000	260	512
		CCGT	252	682	1085	2385	2117
		CCGT	444	47	35	109	79
		CCGT	484	72	262	151	78
		CCTA	356	45	30	38	306
		CCTC	142	451	509	262	946
		CCTC	197	684	472	246	443
		CCTC	379	164	215	80	81
		CCTC	446	45	45	47	153
		CCTG	116	250	722	485	182
		CCTG	164	627	77	764	46
		CCTI	272	225	484	179	98
		CCTI	356	76	82	146	53
		CCTI	445	238	114	47	376

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 57 -

		CCTT	490	1001	11	37	17
		CGAA	83	53601	4861	1634	47001
		CGAA	164	1241	3171	258	2701
		CGAC	166	5401	12531	1829	10391
		CGAC	267	5031	791	680	609
		CGAC	364	169	651	415	336
		CGAG	262	23	2081	146	600
		CGAG	302	373	491	217	335
		CGAG	352	120	491	155	185
15	IMX2_57	CGAT	176	1458	7221	192	188
		CGCA	209	431	161	233	251
		CGCA	221	787	381	113	138
10	IMX2_46	CGCG	458	195	108	1280	793
		CGCG	460	230	89	1136	732
47	IMX2_58	CGCG	472	846	115	44	45
		CGCG	491	148	70	145	285
		CGGA	205	41	276	112	291
48	IMX2_59	CGGC	323	1873	1563	344	544
		CGGG	123	296	431	648	521
		CGGG	245	486	162	280	364
		CGGT	468	29	31	50	80
		CGTC	310	134	3651	399	217
		CGTG	153	482	2381	157	245
		CGTG	374	340	1521	88	216
		CGTT	90	231	10681	1139	306
		CTAA	87	2094	8171	719	2495
		CTAA	98	722	4701	272	296
		CTAC	336	431	2491	517	653
		CTAC	452	28	189	87	40
		CTAG	406	457	149	307	479
		CTAT	175	313	295	71	75
		CTAT	348	353	327	525	737
		CTCA	223	2614	726	2346	2193
		CTCA	242	661	74	172	146
		CTCA	329	1431	63	84	150
		CTCA	347	1791	62	57	178
		CTCA	391	30311	972	1564	2427
21	IMX2_33	CTCC	198	151	210	1699	2347
		CTCC	287	110	38	45	129
		CTCC	308	440	188	493	622
12	IMX2_48	CTCC	386	35	43	233	103
		CTCG	188	1648	225	1027	1373
		CTCG	428	157	561	220	262
49	IMX2_60	CTCG	472	486	28	15	20
		CTCT	117	111	3701	213	161
		CTCT	407	59	371	107	91
		CTGC	147	300	763	888	484

WG 00/77166

PCT/US00/15973

- 58 -

		CTGC	257	908	711	2519	1665
		CTGC	414	463	70	223	550
		CTGG	200	1421	332	1230	1459
		CTGG	272	624	214	572	638
		CTGG	414	119	58	109	149
		CTTA	395	81	27	73	186
		CTTC	247	562	239	377	431
		CTTC	404	82	111	85	243
		CTTG	205	363	607	283	230
		CTTG	258	299	86	121	158
		CTTG	297	450	160	630	472
		CTTG	354	236	95	162	300
		CTTG	366	507	170	434	717
		CTTT	400	71	30	101	283
		CTTT	410	41	48	67	138
		CTTT	453	74	20	64	187
		GAAA	305	106	111	210	126
		GAAC	279	75	49	199	217
		GAAG	95	628	604	1402	449
		GACA	386	300	123	132	362
		GACA	400	802	295	412	1007
		GACC	119	217	771	217	202
		GACC	129	1056	3122	2325	1367
		GACG	89	1849	741	474	324
		GACG	169	502	538	464	179
		GACG	283	150	111	223	328
		GACG	381	43	44	161	53
		GACT	83	371	878	473	299
		GACT	315	894	554	823	1160
		GAGA	220	198	561	395	297
		GAGA	368	149	71	66	146
		GAGC	88	275	782	236	166
		GAGC	262	1703	474	511	1530
		GAGC	419	97	56	165	227
		GAGG	88	1550	2018	736	639
		GAGG	112	304	701	1046	788
		GAGG	253	143	59	75	107
		GAGT	197	1309	3415	1817	860
		GATA	339	200	131	32	42
		GATC	156	483	1229	764	551
		GATC	253	167	152	293	133
		GATC	450	434	180	389	477
24	IMX2_49	GATG	285	49	40	301	106
		GATT	126	3424	1173	2935	4890
		GATT	214	2246	692	1808	2796
		GCAA	226	173	755	823	572
		GCAA	333	177	41	116	152

WO 80/77166

PCT/US00/15973

- 59 -

		GCAG	118	337	434	654	1602
		GCAT	242	1111	1093	115	369
62	IMX2 70	GCAT	276	2425	1784	183	770
56	IMX2 71	GCAT	361	261	65	168	476
		GCAT	447	93	73	94	176
		GCCC	444	145	77	228	156
		GCCC	452	162	60	209	149
		GCCG	269	770	28	359	512
33	IMX2 15	GCCG	364	72	120	378	206
34	IMX2 16	GCGA	190	169	539	392	140
		GCTA	82	1049	3530	2007	819
		GCTA	269	1387	490	598	1485
		GCTA	452	41	261	150	42
		GCTC	157	1515	467	659	1151
3	IMX2 17	GCTC	245	258	864	1457	514
57	IMX2 72	GCTC	425	460	67	208	650
		GCTG	160	1171	2011	1804	726
		GGAA	416	1601	1067	553	2083
		GGAC	270	62	231	162	93
		GGAC	327	527	145	409	727
		GGAG	274	309	83	398	472
		GGAG	283	266	67	215	306
		GGAG	440	73	38	73	98
		GGAT	276	1016	639	118	259
		GGAT	362	140	35	55	152
		GGCA	341	155	94	56	168
		GGCA	349	214	63	88	192
		GGCC	170	920	103	257	467
		GGCC	327	86	345	470	87
		GGCT	445	447	79	403	606
		GGGA	430	817	139	777	1212
		GGGC	142	1375	565	529	389
		GGGC	355	288	61	205	271
		GGGC	418	53	44	64	99
		GGGG	241	126	389	812	371
35	IMX2 20	GGGT	150	138	190	461	328
61	IMX2 34	GGGT	177	622	1213	3329	2197
		GGTC	117	1171	2648	2360	1133
		GGTC	374	104	72	295	285
		GGTT	268	73	41	22	129
		GTAG	117	204	331	299	1780
		GTAG	437	57	66	146	118
		GIAT	242	407	356	18	73
17	IMX2 61	GIAT	276	896	608	39	189
		GIAT	362	184	67	106	257
		GIAT	382	132	25	30	121
		GIAT	409	40	32	27	116

WO 80/77166

PCT/US80/15973

- 60 -

		GTCA	92	555	813	1400	722
		GTGA	88	968	2297	1809	1928
		GTGC	293	565	160	147	541
		GTGC	442	730	204	705	1245
		GTGT	240	31	24	22	160
		GTGT	276	65	59	97	143
		GTTC	167	104	172	323	318
		GTTC	490	35	24	72	33
		GTTT	198	70	86	203	64
		TAAC	92	144	162	500	167
		TAAC	331	122	45	68	63
		TAAC	395	47	52	104	117
		TAAG	143	88	120	335	162
23	IMX2 21	TAAG	192	129	46	92	594
		TAAG	201	59	120	193	150
		TAAG	244	278	118	107	133
		TAAG	266	44	26	37	90
58	IMX2 73	TAAG	302	4180	1203	490	1807
		TAAT	267	59	131	88	178
		TACC	243	54	91	242	49
		TACC	415	206	218	446	439
		TACG	284	1286	411	984	1079
		TACT	160	1169	944	656	533
40	IMX2 35	TACT	338	235	316	850	781
		TAGA	121	329	139	52	157
		TAGC	219	1774	2833	577	4624
44	IMX2 51	TAGG	80	392	2299	2373	469
		TAGG	175	2013	846	314	489
		TAGT	177	858	886	199	141
4	IMX2 22	TAGT	236	261	118	1534	1085
		TATC	314	379	292	115	241
		TATT	268	80	153	112	238
		TCAG	223	3378	931	1638	3793
36	IMX2 23	TCAT	161	314	800	1426	849
		TCAT	176	1442	802	372	371
6	IMX2 36	TCAT	188	99	856	1141	921
		TCCA	312	430	51	267	553
		TCCC	314	468	74	316	519
		TCCG	472	388	54	24	43
		TCCT	176	1100	1002	2127	1547
25	IMX2 62	TCCT	259	618	175	281	347
20	IMX2 74	TCTC	232	1700	164	230	653
37	IMX2 24	TCTC	365	94	118	819	435
		TCTC	392	27	62	199	126
		TCTG	120	907	1918	925	586
		TCTG	154	219	437	813	345
		TCTG	263	138	301	612	292

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 61 -

		TCTG	381	113	15	17	28
		TCTT	197	396	1276	779	660
		TGAC	175	365	45	54	36
		TGAC	283	340	175	157	71
38	IMX2_25	TGAC	376	9	38	394	448
		TGAC	416	2068	581	787	2274
		TGAT	279	193	129	286	664
19	IMX2_63	TGAT	476	2230	1330	42	139
		TGCA	79	1129	2391	2202	689
		TGCA	124	1783	1512	1373	982
		TGCA	186	203	147	1013	628
		TGCA	217	471	163	66	44
		TGCA	414	35	29	52	120
		TGCC	301	312	267	35	135
39	IMX2_26	TGCC	344	372	598	2223	563
		TGCG	120	186	215	683	581
		TGCG	410	2776	258	1208	2951
		TGCT	89	1267	2754	2523	928
		TGCT	403	61	105	280	208
		TGGA	95	1917	1923	1911	839
		TGGC	80	755	1969	2468	1069
		TGGC	121	185	1280	1415	455
22	IMX2_64	TGGC	175	1747	262	427	73
		TGGC	219	2529	5287	5480	5240
		TGGC	402	185	36	128	104
		TGGT	175	946	288	215	213
5	IMX2_28	TGTA	166	194	554	102	157
		TGTC	154	1177	918	3439	3334
		TGTC	264	5701	4480	1159	2280
45	IMX2_52	TGTC	343	38	26	296	32
		TGTG	266	67	664	294	187
		TGTG	362	1800	943	370	1050
		TTAA	313	140	288	281	340
46	IMX2_53	TTCC	320	29	515	354	109
		TTCG	346	37	255	100	32
		TTCT	267	59	88	98	146
		TTGA	161	161	239	803	467
		TTGC	353	54	92	220	109
		TTGC	383	37	201	573	255
		TTGG	289	139	116	541	324
		TTGT	264	144	264	465	325
		TTTC	149	287	1262	979	147
		TTTT	268	93	150	130	256

TABLE 2

Seq ID	Clone ID	Digital Address (Map1)	Database Match (Accession #)	Relative DST Amount*				Validation Method
				0 Days	4 Days	8 Days	12 Days	
59	IMX2_2	AACG 299	Mouse complement component C3 mRNA (X02782)	382	725	711	705	R
60	IMX2_3	AATG 114	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57960)	176	191	235	332	R
1	IMX2_4	ACAC 320	EST Sotera mouse JhMMS cDNA (AA18128)	669	1306	1281	810	N
28	IMX2_7	ACTC 171	Mouse monokine induced by gamma interferon (M14815)	79	87	722	796	R
30	IMX2_11	AGTC 476	Mouse complement component C3 mRNA (X02782)	207	650	671	517	R
33	IMX2_15	GTCC 364	Mouse FBN1 collagen pro-alpha 1 (U08020)	370	667	565	717	R
23	IMX2_21	TGAG 192	NOVEL	240	408	535	866	N
4	IMX2_22	TAGT 236	Mouse mRNA for serine/threonine kinase (X09040)	2931	3158	3749	4025	N
37	IMX2_24	TCTC 365	Mouse ENK7 mRNA (X53247)	117	136	155	291	N
38	IMX2_25	TGAC 376	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X03690)	136	103	185	548	R
5	IMX2_28	TGTA 166	NOVEL	993	1195	727	699	N
21	IMX2_33	CTCC 198	Mouse secretory leukocyte protease inhibitor mRNA (U73004)	82	331	291	386	R
6	IMX2_36	TCA T 188	EST Basaloid mouse proximal colon MPI RB6	106	148	247	465	N
42	IMX2_40	CATT 90	EST Mus musculus cDNA (AA529850)	51	216	305	56	R
8	IMX2_43	CCAA 272	EST Karolinska Sotter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone (AA571661)	59	114	95	61	N
10	IMX2_46	CGCG 458	EST Sotera mouse lymph node N6MLN Mus musculus cDNA clone 750847 (AA290194)	64	53	223	269	N
12	IMX2_48	CTCC 386	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein 2 (MIP2) (X53798)					R

See Figure 4

EST = Expressed Sequence Tag; NA = Not Applicable; R = Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; N = Northern Blot Analysis *Relative DST Amount = Relative DST Amount for Northern blots have been corrected for background and normalized to the hybridization signal of Cyclophilin. The values were obtained by exposing the Northern blot to a phosphorimager screen and quantifying using the PhosphorImager SI.

See Figure 4

TABLE 2 (continued)									
Seq ID	Clone ID	Digital Address (Mip1)	Database Match (Accession #)	0	4	8	12	Validation Method	
13	MX2_55	CCCC473	EST Barstead mouse irradiated colon MFLRB7 (AA823573)	194	45	0	7	R	
49	MX2_60	C7CG472	EST Barstead mouse irradiated colon MFLRB7 (AA823573)	549	62	11	21	R	
17	MX2_61	GTAT276	EST Barstead mouse pooled organs (AA240177)	297	82	401	524	R	
22	MX2_64	TGGC175	NOVEL	235	0	0	0	N	
57	MX2_72	GCTC425	Homolog to rat G protein gamma-5 Subunit mRNA (M95780)	191	236	155	173	N	
20	MX2_74	TCTC232	EST Barstead mouse irradiated colon MFLRB7 Mus musculus cDNA clone (AA689792)	See Figure 5					R

WO 00/77166

-64-

PCT/US00/15973

TABLE 3

Seq ID	Clone ID	Digital Address (MSP)	Database Match (Accession #)	% Homology	Nucleotide range (bp#)	Nucleotide Database range (bp#)
50	IMX2_1	AAAC 407	Mouse (non-cloned) homolog P1C mRNA (U12680)	99%	1 - 314	435 - 788
59	IMX2_2	AACG 299	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	99%	1 - 268	3456 - 3703
60	IMX2_3	AATG 114	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57960)	96%	1 - 64	545 - 608
1	IMX2_4	ACAC 320	EST Sources mouse 3PBMS cDNA (AA178128)	99%	1 - 264	178 - 441
26	IMX2_5	ACAC 398	Mouse MHC class II protein alpha chain, complete cds (M95514)	98%	1 - 348	653 - 999
27	IMX2_6	ACCT 364	Murine AIDS virus-related protein (S80082)	99%	1 - 310	2716 - 3025
28	IMX2_7	AGTC 171	Mouse monokine induced by gamma interferon (M34813)	83%	1 - 117	321 - 437
29	IMX2_8	AGCA 285	Mus musculus 5S pre rRNA gene (X82564)	98%	1 - 234	6078 - 6300
30	IMX2_11	AGTC 476	Mouse complement component C3 mRNA (K02782)	97%	1 - 414	4673 - 5087
31	IMX2_12	AGTG 244	Mouse mRNA for serum amyloid (X01479)	100%	1 - 185	236 - 420
32	IMX2_13	ATAC 226	Mus musculus I-kappa B alpha chain mRNA (U36277)	100%	1 - 173	835 - 1027
33	IMX2_15	GC CG 364	Mouse PVBN collagen pro-alpha 1 (U38020)	99%	1 - 308	3616 - 3923
34	IMX2_16	GC GA 190	EST Mus musculus 8 cell embryo cDNA 3' end sequence (AJ192405)	91%	1 - 134	11 - 134
3	IMX2_17	GTTC 245	Mouse CEB beta mRNA (U17438)	98%	1 - 192	2815 - 3026
35	IMX2_20	GGGT 150	Mouse MHC class III H2-C4 complement component (M12969)	98%	1 - 99	31 - 129
23	IMX2_21	TAA G 192	NOVEL	N/A	N/A	N/A
4	IMX2_22	TAGT 236	Mouse mRNA for serine/threonine kinase (U90110)	100%	1 - 169	2555 - 2723

EST = Expressed Sequence Tag; N/A = Not Applicable

WO 00/77166

-65-

PCT/US00/15973

TABLE 3 (continued)						
Seq ID	Clone ID	Digital Address (Mseq)	Database Match (Accession #)	% Homology	DST nucleotide range (bp)	Nucleotide homology Database nucleotide range (bp)
36	IMX2_23	TCAAT 161	Mouse glucocorticoid CD28 mRNA (U49430)	99%	1 - 109	1382 - 1190
37	IMX2_24	TCTC 365	Mouse EN-7 mRNA (X53243)	98%	1 - 306	919 - 1222
38	IMX2_25	TGAC 376	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X01669)	99%	1 - 222	494 - 817
39	IMX2_26	TGCG 344	Mouse DNA for alpha globin (X05299)	99%	1 - 291	644 - 1068
40	IMX2_28	TGTA 166	NOVEL	N/A	N/A	N/A
41	IMX2_35	TACT 338	Strategic mouse macrophage (F937306) Mus musculus cDNA clone (AA919822)	98%	1 - 281	61 - 341
42	IMX2_36	TCAAT 188	EST Rathead mouse proximal colon MRLB6 Mus musculus cDNA (AA529850)	99%	1 - 133	336 - 467
43	IMX2_39	ATAA 226	Klone cDNA plasmid mRNA (U49430)	99%	1 - 172	538 - 729
44	IMX2_40	CAAT 90	EST Mus Musculus unfertilized egg (AF023455)	100%	1 - 36	117 - 152
45	IMX2_42	CCAA 201	EST mouse 4-cell embryo (AF041854)	96%	1 - 108	1 - 108
46	IMX2_43	CCAA 272	EST Knowles-Solter mouse blastocyst B1 Mus musculus cDNA clone (AA571661)	98%	1 - 221	282 - 502
47	IMX2_46	CGCG 458	EST Sources mouse lymph node NbMLN Mus musculus cDNA clone 759847 (AA290194)	99%	1 - 298	175 - 471
48	IMX2_48	CTCC 386	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein - 1 (MP2) (X53798)	99%	1 - 331	65 - 395
49	IMX2_49	GATG 285	NOVEL	N/A	N/A	N/A
50	IMX2_51	TAGG 89	Strategic mouse skin (F937313) Mus musculus cDNA clone (AF044111)	100%	1 - 24	23 - 46
51	IMX2_52	TGTC 343	Klone DNA for alpha globin (X05379)	99%	1 - 291	644 - 1068
52	IMX2_53	TTCG 320	Mus musculus short incubation protein Prnf gene, complete cds (U29186)	99%	1 - 283	21054 - 21336
53	IMX2_55	CCCG 473	EST Rathead mouse irradiated colon MRLB7 (AA523373)	97%	3 - 414	37 - 443

TABLE 3 (continued)						
Seq ID	Clone ID	Digital Address (89P)	Database Match (Accession #)	% Homology	Nucleotide homology	
					Database nucleotide range (bp#)	Database nucleotide range (bp#)
15	IMX2_57	CGAT 176	EST Soares mouse NM1 cDNA (AA244542)	96%	1 - 125	125 - 249
47	IMX2_58	CGC G 472	EST Barstead mouse irradiated colon	96%	8 - 226	40 - 255
48	IMX2_59	CGGC 323	EST Soares mouse NM1 cDNA (AA268434)	99%	13 - 256	65 - 308
49	IMX2_60	CTCG 472	EST Barstead mouse irradiated colon	97%	224 - 415	255 - 446
17	IMX2_61	CTAT 276	MPLB07 (AA825731)			
18	IMX2_62	CTAT 276	EST Barstead mouse pooled organs (AA240177)	99%	1 - 226	277 - 523
25	IMX2_63	TCCT 239	NOVEL	N/A	N/A	N/A
19	IMX2_64	TGAT 476	EST CLM-BH7-avd-b-10-0-1.1 NIH BMAP_M_S4	99%	1 - 427	12 - 437
22	IMX2_65	TGGC 175	NOVEL	N/A	N/A	N/A
51	IMX2_66	AAAC 186	Mouse mitochondrial genes coding for rRNAs (U00665)	98%	4 - 141	1431 - 1588
52	IMX2_67	ACCG 238	Human RNA for RNA polymerase (Z23102)	91%	79 - 145	1438 - 1494
53	IMX2_68A	CCGC 266	Mouse mRNA regulated by bone morphogenic protein (X95281)	96%	1 - 207	652 - 838
54	IMX2_68B	CCGC 266	Mouse cytochrome beta-58 (M31775)	98%	1 - 196	468 - 664
55	IMX2_69	CCGT 151	Mouse beta-galactoside-binding lectin (M33215)	95%	1 - 97	524 - 620
56	IMX2_71	GCAT 361	EST Soares mouse 2NME12 cDNA (AA190689)	99%	1 - 307	45 - 350
57	IMX2_72	GCTC 425	Homolog to rat G protein gamma-5 Subunit mRNA (M59578)	95%	1 - 221	88 - 308
58	IMX2_73	TAAG 302	EST Soares 2NME12 cDNA clone (AA116328)	100%	1 - 244	281 - 524
20	IMX2_74	TCTC 212	EST Barstead mouse irradiated colon MPLB07 Mus musculus cDNA clone (AA689792)	95%	1 - 171	175 - 341

WO 00/77166

-67-

PCT/US00/15973

TABLE 4: VERIFIED CANDIDATE MATCHES

Seq ID	Clone ID	Digital Address (MspI)	Gene Identity (Accession #)	Extended Primer (Seq ID No.)
50	IMX2_1	AAAC 407	Mouse ion channel homolog RUC mRNA (U72680)	GAT CGA ATC CGG AAA CGG GGA CCG CTG GTG (Seq ID NO:124)
26	IMX2_5	ACAC 398	Mouse MHC class II protein alpha chain complete cds (M95514)	GAT CGA ATC CGG ACA CCA TAG AGA CCC TGA (Seq ID NO:85)
27	IMX2_6	ACCT 364	Murine AIDS virus related provirus (S80082)	GAT CGA ATC CGG ACC TCA CCG ACC AGC CCA (Seq ID NO:125)
29	IMX2_8	AGCA 285	Mus musculus 45S pre-rRNA gene (X82564)	GAT CGA ATC CGG AGC ACC ACA TCG ATC TAA (Seq ID NO:86)
31	IMX2_12	AGTG 244	Mouse mRNA for serum amyloid (X04479)	GAT CGA ATC CGG AGT GGC AAA GAC CCC AAC (Seq ID NO:126)
32	IMX2_13	ATAC 226	Mouse myosin I-type B alpha chain mRNA (U56277)	GAT CGA ATC CGG ATA CAG CAG CAG CTG GGC (Seq ID NO:69)
34	IMX2_16	GCGA 190	EST Mus musculus 8-cell embryo cDNA 3' end sequence (A010205)	GAT CGA ATC CGG GGG ATG GTG GTG TAT GCC (Seq ID NO:87)
3	IMX2_17	GGTC 245	Mouse CRP-ducatin-alpha mRNA (U37438)	GAT CGA ATC CGG GCT CTG GGT CTA TTG TTC (Seq ID NO:70)
35	IMX2_20	GGGT 150	Mouse MHC class III H2-C4 complement component (M12969)	GAT CGA ATC CGG GGG TGC CAG GTG TGA GAC (Seq ID NO:71)
36	IMX2_23	TGAT 161	Mouse glycoprotein CD28 mRNA (M34563)	GAT CGA ATC CGG TCA TGG GAA CTC AGT ATT (Seq ID NO:72)
39	IMX2_26	TGCC 344	Mouse DNA for alpha globin (X05379)	GAT CGA ATC CGG TGC CCT GTC TGC TCT GAG (Seq ID NO:73)
21	IMX2_33	CTCC 198	Mouse secretory leukocyte protease inhibitor mRNA (U71044)	GAT CGA ATC CGG CTC CCT GTA TCC CAG GCT (Seq ID NO:74)
61	IMX2_34	GGGT 177	Mouse MHC sex-linked protein (M21576)	GAT CGA ATC CGG GGG TGC CAG GTG TGAGGC (Seq ID NO:75)
40	IMX2_35	TACT 338	Strategic mouse macrophage (M17206)	GAT CGA ATC CGG TAC TGT GGA GAC ACA GAC (Seq ID NO:88)
41	IMX2_39	ATAA 226	Mouse testis cDNA clone (A010822)	GAT CGA ATC CGG ATA ACA GTA TGT CTA TGT (Seq ID NO:76)
43	IMX2_42	CCAA 201	EST mouse 4-cell embryo (A004184)	GAT CGA ATC CGG CCA AAC TCT CAA TTA CCA (Seq ID NO:77)

EST = Expressed Sequence Tag

WO 00/77166

-68-

PCT/US00/15973

TABLE 4 (continued): VERIFIED CANDIDATE MATCHES			Gene Identity (Accession #)		Extended Primer (SEQ ID NO)	
Seq ID	Clone ID	Digital Address (N50)				
10	IMX2_46	CGCG 358	EST Source mouse lymph node NEMIN		GAT CGA ATC CCG TCG GCA CCG GCA CCA GAC (SEQ ID NO 78)	
			Mus musculus cDNA clone Z80847 (AA259194)			
24	IMX2_49	GATG 285	NOVEL			
41	IMX2_51	TACG 80	Stratigene mouse skin (#937313) Mus musculus cDNA clone (AB644131)		GAT CGA ATC CCG GAT GTG GCA AGG TTA GAA (SEQ ID NO 89)	
45	IMX2_52	TGTC 343	Mouse DNA for alpha globin (X03759)		GAT CGA ATC CCG TAG GGT AGA GTG TGG CCA (SEQ ID NO 90)	
46	IMX2_53	TTCG 320	Mus musculus short incubation prior			
			Protein Empa gene, complete cds (U29186)		GAT CGA ATC CCG TTC CCA TAT CTT TGA GGG (SEQ ID NO 91)	
15	IMX2_57	CGAT 176	EST Source mouse NML cDNA (AA244542)			
47	IMX2_58	CGCG 472	EST Source mouse irradiated colon		GAT CGA ATC CCG CGA TGT ACA CTC GGG TTA (SEQ ID NO 92)	
			MPL1B7 (AA821573)		GAT CGA ATC CCG CGC GTA TCT GTG TGA ACT (SEQ ID NO 93)	
48	IMX2_59	CGCG 323	EST Source mouse NML cDNA (AA268434)		GAT CGA ATC CCG CGG CCA TAT CCA GTC TGG (SEQ ID NO 94)	
25	IMX2_62	TGCT 259	NOVEL		GAT CGA ATC CCG TCC TGG GAG ACA GAC ATG (SEQ ID NO 95)	
19	IMX2_63	TGAT 476	EST 11M-HH3-avdk-1164-L1.1		GAT CGA ATC CCG TAA GAG LAA CTT CTC (SEQ ID NO 96)	
			NIH BMAP M 54 Mus musculus cDNA clone (AW95679)			
51	IMX2_65	AAAC 186	Mouse mitochondrial genes, Cloning for RNAs (V06665)		GAT CGA ATC CCG AAA CCG CCA AAC CAA ACG (SEQ ID NO 80)	
52	IMX2_66	ACGG 238	Human RNA for RNA polymerase (Z23102)		GAT CGA ATC CCG AGG GAG GAC CAC CGG TGC (SEQ ID NO 81)	
53	IMX2_68A	CCGC 266	Mouse mRNA regulated by bone morphogenetic protein (X95281)		GAT CGA ATC CCG CGG CCA CCC AAC AAC TTT (SEQ ID NO 97)	
54	IMX2_68B	CCGC 266	Mouse cytochrome beta 558 (M11775)		GAT CGA ATC CCG CGG CGC CCA GAG GTG CGA (SEQ ID NO 98)	
55	IMX2_69	CCGT 151	Mouse beta-galactoside Binding Lectin (M33215)		GAT CGA ATC CCG CGG TGT GTG CCG TAG GAG (SEQ ID NO 82)	
62	IMX2_70	GCA T 276	Mouse mRNA for preprolactin II (X04573)		GAT CGA ATC CCG GCA TCT AAT GGC CAG TGG (SEQ ID NO 83)	
56	IMX2_71	GCAT 361	EST Source mouse JRMET2 cDNA (AA119089)		GAT CGA ATC CCG GCA TCC ATG GGT TCC AAC (SEQ ID NO 84)	
58	IMX2_73	TAA G 302	EST Source ZNEMT cDNA clone (AA116228)		GAT CGA ATC CCG TAA GCA TGG CAA GAC CCG (SEQ ID NO 99)	

EST = Expressed Sequence Tag

TABLE 5: RT-PCR Validation Primers

Seq ID	Clone ID	Digital Address (Msp1)	Database Match (Accession #)	5' RT-PCR Primer and 3' RT-PCR Primer
59	IMX2_2	AAAG 299	Mouse complement component C3 mRNA (U02782)	CACAGCCTTC GTCTCATCG CACTGC (SEQ ID NO:100) TTG TTATCA TCA GGGCCGAGGC ATACCC (SEQ ID NO:101)
60	IMX2_3	TAATG 114	Mouse mRNA for ribosomal protein L7 (X57996)	TTTGAAAGTCT CGTGTGACGC CCACTC (SEQ ID NO:102) TCAGGCCCC CCGTCCCACTCC (SEQ ID NO:103)
28	IMX2_7	ACCTC 171	Mouse membrane induced by gamma interferon (U34815)	CGAAGTCTCA GGCCTCTGCT TT (SEQ ID NO:104) TGGTCTCCAC TGTAGAACCC CAAAAA (SEQ ID NO:105)
30	IMX2_11	AGTTC 476	Mouse complement component C2 mRNA (U02782)	CACATAGAGT GTTGAGTATG TTGGA (SEQ ID NO:106) CGAGTCTTC GTAGCTGCTT TGGTGA (SEQ ID NO:107)
33	IMX2_15	GGCG 364	Mouse FVB/N collagen alpha-1 mRNA (U38020)	CGAGCTCTCA GATGTGCC ACT CTGA (SEQ ID NO:108) ACAGCTTCTC CTGAGCACTA GAGGCC (SEQ ID NO:109)
38	IMX2_25	TGACC 376	Mouse mRNA for Ig heavy chain (X03680)	GAACTCAAGTA CTGACACCTC AAACCT (SEQ ID NO:110) GCACATGTCGG AGGACAGCTT CTCCTA (SEQ ID NO:111)
21	IMX2_33	CTCTC 198	Mouse secondary dendritic to protease inhibitor mRNA (U39004)	CAGCTGTGGAG GAAACCTTGGG AGGTGG (SEQ ID NO:127) CACTATCGGGG CCAAGTGGAG ATTCT (SEQ ID NO:128)
42	IMX2_40	CATT 90	EST Mus musculus unfertilized egg (AU023455)	ATGAAAATA TGGAAATATGA TAAAA (SEQ ID NO:112) CTAAATATTT CTGAAATGTG GTTTT (SEQ ID NO:113)
12	IMX2_48	CTTCC 386	Mouse mRNA for macrophage inflammatory protein -1 (MIP2) (U55798)	GCCGACGAG AAGCTATAGC CACTC (SEQ ID NO:114) TTATATGCTC TCCGCTTGAG TGACAA (SEQ ID NO:115)
13	IMX2_55	CCCTC 473	EST Barred mouse irradiated colon MPLB87 (AA823573)	GAGTGTGCT CAGGTGATTC AGGA (SEQ ID NO:116) CCCCCATCTT CAGTCTGCTT TTGT (SEQ ID NO:117)
49	IMX2_60	CTTCC 472	EST Barred mouse irradiated colon MPLB87 (AA823573)	CCAGTGGGTA GGAACAGGCTT GAA (SEQ ID NO:118) CCACATGCTC CCAACAGAGG AAATC (SEQ ID NO:119)
17	IMX2_61	GTAAT 276	EST Barred mouse probed organs (AA240177)	GCAGTGTGAT GCACA TCGTCA (SEQ ID NO:121) GGGGCAATGTG GCAGTAAATG CTCCTA (SEQ ID NO:122)
20	IMX2_74	TCTCT 232	EST Barred mouse irradiated union MPLB7 Mus musculus cDNA clone (AA689792)	CTGTGTTGAC AGAGACGCCAG TAGT (SEQ ID NO:123)

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 70 -

EXAMPLE 2RT-PCR Validation

RT-PCR validation of cloned DSTs was performed, and results are presented in Table 2. The starting amount of template was chosen based on a control curve that was generated to accurately define the linear range of amplification for the given cloned DST. Based upon the intensity of the peak cloned from the TOGA™ panel, the following amounts of template were chosen:

	<u>TOGA peak intensity</u>	<u>Low [cDNA]</u>	<u>High [cDNA]</u>
	0 – 400	2000 pg	5000 pg
	300-1000	400 pg	2000 pg
	> 1000	50 pg	250 pg

The PCR primers used for validation of cloned DSTs are listed in Table 5. Duplicate reaction mixtures were assembled using the appropriate low and high concentration of cDNA template chosen from the time point sample showing the strongest TOGA™ signal. The reaction mixtures were cycled for 23, 26, 29, 32, 35, and 38 cycles. The resulting amplification products from the duplicate reactions were quantitated and plotted against the cycle number to generate a standard curve. From these data, the cycle number and cDNA concentration combination which yielded acceptable levels of PCR product within the linear range of amplification were chosen for RT-PCR validation across the various time-points.

The RT-PCR validation consisted of assembling triplicate reactions using the chosen concentration of cDNA cycled to the defined cycle number. For example, the data in Table 2 for IMX2_55 (SEQ ID NO:13) were generated using 50 pg cDNA template and 29 cycles. An internal control primer pair amplified under the same conditions was also performed to provide the basis for normalizing any differences between the cDNA templates.

EXAMPLE 3RT-PCR Analysis Using Fluorimetry

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 71 -

Two DSTs were validated using an alternative protocol. The primers used for RT-PCR are listed in Table 5. For each DST examined, the optimal annealing temperature and reagent conditions were determined for the corresponding set of primers (see Table 5) based on results from a preliminary experiment. In eight separate reactions, each set of primers was assayed to find the optimal conditions by adjusting the following four parameters: primer concentration, dNTP concentration, MgCl₂ concentration, and Taq polymerase. Once optimal conditions were determined, each DST was run in duplicate multiple simultaneous reactions which usually included at least four dilutions of template, plus control reactions lacking template, and six sequential data points for numbers of cycles.

10

Reactions were performed using "Hot Start" PCR with the Clontech TaqStart antibody system (Cat. #5400-1). Each reaction contained 1 µl of the cDNA library dilution as template, determined amounts of AmpliTaq DNA polymerase (cat. #N808-0156), MgCl₂, dNTPs (GibcoBRL cat. #10297-018), primer, and Clontech TaqStart Antibody in a 20 µl reaction volume using 10x Taq buffer II (without MgCl₂). Typically, a master mix containing all components except the template was prepared and aliquoted. Various templates were then added to these master mix samples and 20 µl volumes were subsequently dispensed into individual reaction tubes. During the PCR run, tubes were removed sequentially on a predetermined schedule in order to quantitate expression of the target DST over a "window" of cycles. After amplification, the samples were quantified via fluorimetry.

20

PCR was performed at annealing temperatures about 5 degrees above the lowest melting temperature of each primer pair using the following program: 1) 95 degrees Celsius, 3 minutes; 2) 95 degrees Celsius, 30 seconds; 3) T_m+5 degrees Celsius, 30 seconds; 4) 72 degrees Celsius, for a time dependent on target length at 16 bp/second; 5) repeat steps 2-4 33 more cycles; 6) 72 degrees Celsius, 3 minutes; 7) 14 degrees Celsius, forever.

25

Following temperature cycling, 2 µl of the PCR reaction was added to 140 µl of a 1:250 dilution of PicoGreen (Molecular Probes cat. #P-11495 (10x100 µl)) in TE pH 7.5 in a 96-well Costar UV microtiter plate (Fisher cat. #07-200623). The samples were mixed gently for 1.5 minutes and allowed to equilibrate at room temperature in the dark for 15 minutes. The concentration of the PCR products was quantified by fluorimetry using a PerSeptive Biosystems CytoFluor series 4000 multi-well plate reader.

30

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 72 -

Background fluorescence was determined by using duplicate control samples that were cycled with all reaction components except the template. The mean value from these duplicate background control samples was subtracted from the corresponding experimental values prior to analyzing results. The sensitivity of the PicoGreen dsDNA assay is reported to be 250pg/ml (50pg dsDNA in a 200 μ l assay volume) using a fluorescence microplate reader such as was used in these measurements.

The results of the quantified RT-PCR of IMX 2_48 for a 1:2000 dilution of the library are shown in Figure 4 (in arbitrary fluorescence units) and in Table 6 (normalized to the control value at each time point). The results of the quantified RT-PCR of IMX 2_74 for a 1:500 dilution of the library are shown in Figure 5 (in arbitrary fluorescence units) and in Table 6 (normalized to the control value at each time point).

Table 6									
IMX2_48					IMX2_74				
Cycle	1:2000 0d	1:2000 4d	1:2000 8d	1:2000 12d	cycle	1:500 0d	1:500 4d	1:500 8d	1:500 12d
24	1.0	0.9	1.0	1.0					
26	1.0	2.4	2.0	1.4	26	1.00	0.17	0.12	0.38
28	1.0	3.3	3.4	3.4					
30	1.0	4.5	6.7	6.1	29	1.00	0.25	0.33	0.44
32	1.0	3.9	10.2	11.3	32	1.00	0.60	0.56	0.70
34	1.0	15.5	36.0	36.5					
TOGA	1.0	1.6	7.3	2.8	TOGA	1.00	0.10	0.14	0.38

15

Table 7
Relationships of Extended Sequences

Seq ID	Extended Sequence ID	DST Alignment to Extended Sequence (bp #)	Database Match (Accession #)	% Homology	Nucleotide extended range of sequence (bp #)	Nucleotide homology range (bp #)
2	IMX2_4 EX1	688 - 957	Homology to Homo sapiens chromosome 19, cosmid R2765b, complete sequence (AC007565.1)	76% 71% 73% 83% 79% 62% 59% 75% 67% 60% 62% 75% 77%	2 - 97 51 - 200 214 - 282 255 - 297 297 - 450 529 - 646 714 - 837 792 - 832 792 - 871 792 - 891 796 - 916 884 - 915	7692 - 7785 15459 - 15518 19159 - 19225 22411 - 22453 28497 - 28651 28700 - 28820 8337 - 8515 41775 - 41835 16338 - 16414 39753 - 39848 36657 - 36785 18855 - 18907 25677 - 25729
7	IMX2_36 EX1	293 - 427	Mus musculus DAPI 2 mRNA, complete cds (AF024637.1)	100%	1 - 254	92 - 345
9	IMX2_43 EX1	1097 - 1298	Mus musculus KAK-associated protein mRNA, complete cds (AF078291.1)	100%	1 - 254	92 - 345
11	IMX2_46 EX1	157 - 561	Homology not determined			
			Homology to Homo sapiens regulator of Fas-induced apoptosis (TOSC) mRNA (PM_105449.1)	74%	113 - 370	913 - 1170

Table 7, continued

Seq ID	Extended Sequence ID	DST alignment to Extended Sequence (bp #)	Database Match (Accession #)	% Homology	Nucleotide range of extended sequence (bp #)	Nucleotide homology range (bp #)
14	IMX2_55 EX T	332 - 744	Homology to R. norvegicus C-reactive protein mRNA, complete cds. (M83176.1) Murine mRNA for C-reactive protein (CRP) (X17496.1) Mus musculus C-reactive protein, placental related (Cnp). mRNA (NM_007768.1)	65% 56% 62% 59% 62%	119 - 253 303 - 367 4 - 118 194 - 567 4 - 118 194 - 567	115 - 253 299 - 363 80 - 194 277 - 650 80 - 194 277 - 650
16	IMX2_57 EX T	283 - 408	Homology to H. sapiens mRNA for chymotrypsin-like protease (CTRL-1) (X71877.1) Homology to Homo sapiens chymotrypsin-like (CTRL) mRNA (NM_001907.1) Homology to H. sapiens genes for proteasome-like subunit (MECL-1), chymotrypsin-like protease (CTRL-1) and protein serine kinase (PSK-H), last exon	84% 84% 83% 83% 84%	7 - 363 7 - 363 7 - 55 52 - 187 179 - 363	464 - 820 464 - 820 8641 - 8648 8773 - 8908 8900 - 9174
18	IMX2_61 EX T	204 - 425	Homology not determined			

WG 00/77166

PCT/U500/15973

- 75 -

EXAMPLE 4Extended Sequence Clone for IMX2_4

The clone was isolated from a D4/D8 DSS colon library using the Cloncapture
5 procedure from Edge Biosystems. The library was constructed by Edge Biosystems for
Immunex from RNA isolated from D4 and D8 inflamed colons from DSS treated C57BL/6
mice. The clone is in an Edge vector pEAK12.

IMX2_04 DST (SEQ ID NO:1) matches extended sequence for IMX2_04 from base
10 688 to 957 (SEQ ID NO:2) (See Table 7, above). There is an open reading frame starting at
base 1 that may encode a partial gene product. The amino acid sequence of the encoded
partial protein is given in SEQ ID NO:129.

When the extended sequence was compared to NCBI nr database w/BLAST, linear
15 segments of the nucleotide sequence for bases 1-936 show about 70% identity with segments
of the nucleotide sequence of a cosmid clone from human chromosome 19, AC007565.1
(See Table 7, above). This indicates that the human homologue of IMX2_4 is, at least in part,
found on the cosmid. However, several exons predicted on the cosmid (by GRAIL program
or by some homology to mouse ESTs) are skipped by the linear sequence of IMX2-4-
20 E10.seq. It appears that one predicted, yet skipped exon, is real in that a perfect match is
found in the DERWENT database. The Derwent entry is for a "secreted" molecule with the
protein fragment in the Derwent protein entry being a signal peptide containing amino acid
sequence not found on the cosmid (or the nucleotide Derwent entry). However, the Derwent
nucleotide entry also has a match to another more 5' segment of the cosmid which does show
25 a match with the 5' end of IMX2-4-E10.seq at the 75% identity level. These forms may
represent different splice variants of a secreted protein.

EXAMPLE 5

30 Extended Sequence Clone for IMX2_36

The IMX2_36.EXT sequence information was derived from the clone
IMX2_36pT7T3-2.seq which is an EST clone derived from FVB/N mouse proximal colon
obtained from IMAGE consortium. The accession number for the EST is AA529850, and the

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 76 -

clone id is IMAGE:921608. The EST is in the pT7T3 vector. The IMX2_36.DST (SEQ ID NO:6) matches the extended sequence for IMX2_36.EXT (SEQ ID NO:7) from base 293 to 427 (See Table 7, above). Blast of the EST to GenBank gives hits to 'mouse KAR (killer activating receptor)' and 'DAPI2 protein' (See Table 7, above).

5

EXAMPLE 6

Extended Sequence Clone for IMX 2_43

The clone was isolated from a D4/D8 DSS colon library using the Cloncapture procedure from Edge Biosystems. The library was constructed by Edge Biosystems for Immunex from RNA isolated from pooled D4 and D8 inflamed colons from DSS treated C57BL/6 mice. The clone is in the Edge vector pEAK12. The IMX2_43.DST (SEQ ID NO:8) matches the IMX2_43 extended sequence (SEQ ID NO:9) from base 1079 to 1298 (See Table 7, above).

15

EXAMPLE 7

Extended Sequence Clone for IMX 2_46

The IMX2_46.EXT sequence information was derived from the two clones IMX2_46pT7T3-6.seq and IMX2_46pT7T3-7.seq, which are EST clones in the pT7T3 vector that were obtained from IMAGE consortium. IMX2_46pT7T3-6.seq (accession number AA290194, clone id IMAGE:750847) was derived from C57BL/6 mouse lymph node. IMX2_46pT7T3-7.seq (accession number AA174968, clone id IMAGE: 617717) was derived from C57BL/6 mouse spleen. The IMX2_46.DST (SEQ ID NO:10) aligns with the IMX2_46.EXT extended sequence (SEQ ID NO:11) from base 157 to 561 (See Table 7, above).

25

Blast of ESTs against GenBank gives hits to human TOSO: regulator of fas-induced apoptosis (See Table 7, above).

30

EXAMPLE 8

Extended Sequence Clone for IMX 2_55

The IMX2_55.EXT extended sequence information was derived from the two clones IMX2_55pT7T3-8.seq and IMX2_55pT7T3-24.seq, which are EST clones that were obtained

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 77 -

from IMAGE consortium. IMX2_55pT7T3-8.seq (accession number AA823573, clone id IMAGE:1079189) was derived from FVB irradiated mouse colon. IMX2_55pT7T3-24.seq (accession number AA690372, clone id IMAGE:1164692) was derived from FVB mouse proximal colon.

5

The accession number for the EST for IMX2_55pT7T3-8.seq is AA823573, and the clone id is IMAGE:1079189. The accession number for the EST for IMX2_55pT7T3-24.seq is AA690372, and the clone id is IMAGE:1164692. The both ESTs are in the pT7T3 vector and were obtained from IMAGE consortium. IMX2_55pT7T3-8.seq clone was derived from FVB irradiated mouse colon and IMX2_55pT7T3-24.seq clone was derived from FVB mouse proximal colon. The IMX2_55 DST (SEQ ID NO:13) aligns bases of 322 to 744 with the extended sequence IMX2_55.EXT (SEQ ID NO:14) (See Table 7, above).

10

Blast of the extended IMX2_55 sequence to GenBank discloses ESTs with homology to C reactive protein (See Table 7, above).

15

EXAMPLE 9

Extended Sequence Clone for IMX 2_57

PCR primers were designed for IMX2_57 based on sequence information obtained from the sequences of two EST clones that were commercially unavailable. The EST clones used for deriving sequence information were (1) an EST with accession number AA240177 and clone id IMAGE:679264 derived from mouse liver and (2) an EST with accession number AV005227 and clone id 0910001G08 derived from C57BL/6 spleen.

20

The primers used were forward primer IMX2_57-FP and reverse primer IMX2_57-RP which prime off the sequence obtained from electronically assembling the DST and the EST AV005227. The PCR reaction was performed on cDNA derived from RNA prepared from C57BL/6 mouse colon. The PCR product was cloned into the pGEM vector resulting in the clone IMX2_57PCR1. The IMX2_57 DST, (SEQ ID NO:15) aligns with bases 283 to 408 of the extended sequence IMX2_57.EXT (SEQ ID NO:16) (See Table 7, above).

25

30

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 78 -

Blast of assembled ESTs to Genbank gives hits to 'human chymotrypsin-like (CTRL) mRNA' and 'human proteasome-like subunit (MECL-1), chymotrypsin-like protease (CTRL-1) and protein-serine kinase (PSK-H1) last exon' (See Table 7, above).

5

EXAMPLE 10Extended Sequence Clone for IMX2_61

The IMX2_61 extended sequence information was derived from the EST clone IMX2_61pBS-47.seq, an EST clone that was obtained from IMAGE consortium. The
10 accession number for the EST for IMX2_61pBS-47.seq is AA981092, and the clone ID is IMAGE:1279287. The IMX2_61pBS-47.seq clone was derived from WEHI3 mouse macrophage cells. The IMX2_61 DST (SEQ ID NO:17) aligns with bases 204 to 425 of the IMX2_61 extended sequence (SEQ ID NO:18) (See Table 7, above).

15

EXAMPLE 11Extended Sequence Clone for IMX2_17:Crypt-ductin alpha scavenger receptor (CRP-ductin)

TOGA analysis indicated that IMX2_17 (SEQ ID NO:3) corresponds to *Mus musculus* CRP-ductin-alpha mRNA, accession number U37438 (Table 3). CRP-ductin
20 localizes to the apical portion of crypt cells in the small intestine. In the colon, it is seen predominantly in surface epithelial cells (EC). It is also seen in the apical portion of the EC lining pancreatic and larger hepatic ducts. The CRP-ductin-alpha sequence predicts a mosaic protein with a short cytoplasmic region, a transmembrane domain and a large extracellular
25 region composed of many repeats. The extracellular region contains 21 potential N-glycosylation sites in the C-terminal half of the protein. There are also two potential phosphorylation sites in the cytoplasmic domain.

Forward primer mCRP.5179-FP and reverse primer mCRP.6106-RP were used to
30 PCR a 936 bp product from a cDNA template derived from RNA isolated from C57BL/6 colon. The PCR product was subcloned into the pGEM vector and the sequence was verified before being used as a probe for Northern blot analysis.

WQ 0077166

PCT/US00/15973

- 79 -

Figure 6 presents the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_17, SEQ ID NO: 3, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples from and size standards was blotted after electrophoresis, probed with a labeled probe corresponding to U37438 bases 5179-6106, imaged using a phosphorimager and quantified. Figure 6A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 6B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice treated with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment. The predicted transcript size for IMX2_17 CRP-ductin is 6.6 Kb; the actual transcript size found in this study was approximately 6.5 Kb.

Northern blots were performed on mRNA samples from several models of IBD.

Analysis of samples from C57BL/6 mice with DSS colitis showed high levels of constitutive expression in the large intestine, maximal at day 8 of DSS colitis (Figure 6A), consistent with the results of the initial TOGA analysis (Table 1). Analysis of samples from Balb/c mice with DSS colitis showed similar results (Figure 6B).

Analysis of samples from C57BL/6 mice with α CD3 ileitis showed low levels of constitutive expression in the small intestine that increases early in inflammation (Figure 6A) reaching a maximum at six hours and declining thereafter. Analysis of samples from Balb/c mice with α CD3 ileitis showed similar, though less intense, results (Figure 6B).

Constitutive expression was seen in FVB large intestine samples (Figure 6A). Increased expression in healthy mdr knock-out mice with no signs of colitis, with little further increase in expression in mdr knock-out mice with active colitis (Figure 6A).

The expression shown on the Northern blot of Figure 6 was quantified and normalized to the amount of G3PDH in each lane. The normalized results are shown in Table 8, below.

30

WG 0077166

PCT/US00/15973

- 80 -

Table 8 Quantitation of Figure 6		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	27740	11455
Day 4	30853	21102
Day 8	43857	28838
Day 12	22622	26248
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	11832
5 %	Not Done	21278
8 %	Not Done	12717
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	2519	2491
6 Hours	14088	7870
30 Hours	11144	1287
72 Hours	9000	2238
Constitutive Expression		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
14427	29166	15988

EXAMPLE 12Extended Sequence Clone for IMX 2_22IMX2_22 Hematopoietic Progenitor Kinase HPK1

5

TOGA analysis indicated that IMX2_22 corresponds to *Alus musculus* mRNA for serine/threonine kinase, accession number Y09010 (Table 3). HPK1 is a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway.

10

Forward primer mHPK1.1640-FP and reverse primer mHPK1.2420-RP were used to PCR a 780 bp product from a cDNA template was derived from RNA isolated from C57BL/6 colon. The PCR product was subcloned into the pGEM vector and was sequence verified before being used as a probe for Northern blot analysis. The predicted transcript size for IMX2_22 HPK1 was 2.7 Kb and published transcript sizes are 2.8 Kb and 3.6 Kb. The

15

actual transcript size found in this study was 2.8Kb.

Figure 7 presents the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_22, SEQ ID NO: 4, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed with a labeled probe corresponding to bases 1640-2420 of Y09010, imaged using a phosphorimager and

20

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 81 -

quantified. Figure 7A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment. C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis, mdr knock-out mice with colitis and C57BL/6 spleen. Figure 7B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment and C57BL/6 normal lymphoid tissue samples (MLN, PP, spleen and thymus).

Northern blots were performed on mRNA samples from several models of IBD.

Analysis of samples from C57BL/6 mice with DSS colitis showed low levels of constitutive expression in the large intestine, maximal at day 12 of DSS colitis (Figure 7A), not very consistent with the results of the initial TOGA analysis (Table 1). Analysis of samples from Balb/c mice with DSS colitis showed similar results with a maximum at day 8 (Figure 7B).

Analysis of samples from C57BL/6 mice with α CD3 ileitis showed constitutive expression in the small intestine that decreases at six hours (Figure 7A). Analysis of samples from Balb/c mice with α CD3 ileitis showed similar results (Figure 7B).

Increased expression in mdr knock-out mice with active colitis (Figure 7A), in contrast to little change in corresponding TOGA analysis (data not shown).

Strong expression was found in lymphoid tissues in MLN, PP, thymus, especially the spleen (Figure 7A & B).

The expression shown on the Northern blot of Figure 7 was quantified and normalized to the amount of G3PDH in each lane. The normalized results are shown in Table 9, below.

Table 9		
Quantitation of Figure 7		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	56	271
Day 4	64	143
Day 8	82	502
Day 12	419	341

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 82 -

Anti CD3 Induced Ileitis			
	9 Hours	614	269
	6 Hours	133	47
	30 Hours	465	341
	72 Hours	168	149
Constitutive Expression			
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis	
59	146	739	
Normal Tissue			
MLN	PP	Spleen	Thymus
10008	4883	33260	8826

EXAMPLE 13Extended Sequence Clone for IMX 2_28Down-Regulated in Adenoma protein (DRA)

TOGA analysis indicated that IMX2_28 corresponds to *Mus musculus* DRA down-regulated in adenoma protein, accession number AF136751 (Table 3).

Forward primer Dra.1551-FP and reverse primer Dra.2390-RP were used to PCR an 840 bp product from a cDNA template derived from RNA isolated from C57BL/6 colon. The PCR product was subcloned into the pGEM vector and was sequence verified before being used as a probe for Northern blot analysis. The predicted transcript size for IMX2_28 DRA is 2.6 Kb; the actual transcript size found in this study was approximately 3 Kb.

Figure 8 presents the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_28, SEQ ID NO: 5, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed with a labeled probe corresponding to bases 1551-2390 of AF136751, imaged using a phosphorimager and quantified. Figure 8A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 8B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment. Balb/c mice treated with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 83 -

Northern blots were performed on mRNA samples from several models of IBD. Analysis of samples from C57BL/6 mice with DSS colitis showed high levels of constitutive expression in the large intestine that decrease with inflammation, minimal at day 8 of DSS colitis (Figure 8A), consistent with the results of the initial TOGA analysis (Table 1).

5 Analysis of samples from Balb/c mice with DSS colitis showed the same pattern (Figure 8B).

Analysis of samples from C57BL/6 mice with α CD3 ileitis showed levels of constitutive expression in the small intestine lower than that seen in the large intestine with DSS colitis. Expression decreases with inflammation rapidly by 6 hours and remains low (Figure 8A). Analysis of samples from Balb/c mice with α CD3 ileitis showed the same
10 pattern (Figure 8B). TOGA analysis in this model (data not shown) did not show a corresponding peak.

Constitutive expression was seen in FVB large intestine samples (Figure 8A).
15 Constitutive expression was seen in healthy mdm knock-out mice with no signs of colitis, with a dramatic decrease in expression seen in mdm knock-out mice with active colitis (Figure 8A). TOGA analysis in this model (data not shown) did not show a corresponding peak.

The expression shown on the Northern blot of Figure 8 was quantified and normalized
20 to the amount of G3PDH in each lane. The normalized results are shown in Table 10, below.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 84 -

Table 10 Quantitation of Figure 8		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	25541	34441
Day 4	20316	35270
Day 8	7569	22711
Day 12	10218	22481
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	22463
5 %	Not Done	19861
8 %	Not Done	17548
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	5937	3534
6 Hours	2211	1275
30 Hours	2192	2051
72 Hours	5300	4142
Constitutive Expression		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out + Colitis
55232	28854	5046

EXAMPLE 14

Extended Sequence Clone for IMX2_33

Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI)

TOGA analysis indicated that IMX2_33 corresponds to *Mus musculus* secretory leukocyte protease inhibitor, accession number U73004 (Table 3). Secretory leukocyte protease inhibitor is an epithelial cell and macrophage derived inhibitor of leukocyte serine proteases. SLPI expression is suppressed by gamma-IFN. SLPI is an LPS induced gamma-IFN suppressible phagocyte product that serves to inhibit LPS responses.

Forward primer mSLPI447-FP and reverse primer mSLPI 800-RP were used to PCR a 350 bp product from a cDNA template was derived from RNA isolated from C57BL/6 colon. The PCR product was subcloned into the pGEM vector and the sequence was verified before being used as a probe for Northern blot analysis. The probe used corresponded to bases 447-800 of U73004. The predicted transcript size for IMX2_33 SLPI is 1.1 Kb; the actual transcript size found in this study was 1.1 Kb.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 85 -

Figure 9 presents the results of Northern blot analysis of clone IMX 2_33, SEQ ID NO:21, where an agarose gel containing poly A enriched mRNA from the experimental samples and size standards was blotted after electrophoresis, probed, imaged using a phosphorimager and quantified. Figure 9A shows the results from C57BL/6 mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, C57BL/6 mice with α CD3 ileitis 0, 6, 30 or 72 hours after treatment, as well as samples from large intestines from FVB, mdr knock-out mice without colitis and mdr knock-out mice with colitis. Figure 9B shows the results from Balb/c mice with DSS colitis 0, 4, 8, or 12 days after treatment, Balb/c mice treated with 0%, 5% and 8% DSS, and Balb/c mice with α CD3 ileitis (0, 6, 30, 72 hours).

Northern blots were performed on mRNA samples from several models of IBD. Analysis of samples from C57BL/6 mice with DSS colitis showed minimal constitutive expression in the large intestine that increases significantly with inflammation, maximal at day 8 of DSS colitis and still high at day 12 (Figure 9A), consistent with the results of the initial TOGA analysis (Table 1). Analysis of samples from Balb/c mice with DSS colitis showed the same pattern (Figure 9B).

Analysis of samples from C57BL/6 mice with α CD3 ileitis showed low to moderate levels of constitutive expression in the small intestine with less regulation than seen in the large intestine with DSS colitis. There was a significant increase with inflammation maximal at 30 hours, then decreasing (Figure 9A). Analysis of samples from Balb/c mice with α CD3 ileitis showed the same pattern (Figure 9B). The pattern was consistent with that seen in TOGA analysis in this model (data not shown).

Minimal constitutive expression was seen in healthy mdr knock-out mice with no signs of colitis, with an increase in expression seen in mdr knock-out mice with active colitis (Figure 9A). The pattern was consistent with that seen in TOGA analysis in this model (data not shown).

The expression shown on the Northern blot of Figure 9 was quantified and normalized to the amount of G3PDH in each lane. The normalized results are shown in Table 11, below.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 86 -

Table 11		
Quantitation of Figure 9		
IBD Model	C57BL/6	BALB/c
DSS induced colitis		
Day 0	78	197
Day 4	1580	2237
Day 8	7491	8170
Day 12	6313	4390
DSS Concentration Effect		
0 %	Not Done	-54
5 %	Not Done	3201
8 %	Not Done	-688
Anti CD3 Induced Ileitis		
0 Hours	658	130
6 Hours	832	1100
30 Hours	1465	2572
72 Hours	526	1245
Constitutive Expression		
FVB	Mdr Knock Out	Mdr Knock Out - Colitis
965	14305	20085

EXAMPLE 15**Extended Sequence Clone for IMX2_48**

5 **IMX2_48 macrophage inflammatory protein 2 (MIP2)**

TOGA analysis indicated that IMX2_48 corresponds to *Mus musculus* MIP-2, macrophage inflammatory protein 2, accession number X53798 (Table 3).

10 Forward primer MIP2.61-FP and reverse primer MIP2.345-RP were used to PCR a 284 bp product from a cDNA template was derived from RNA isolated from C57BL/6 colon. The PCR product was subcloned into the pGEM vector and the sequence was verified. The predicted transcript size for IMX2_48 MIP2 is 1.1 Kb.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 87 -

We claim:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide chosen from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 and SEQ ID NO:62.
2. An isolated polypeptide encoded by a polynucleotide chosen from the group consisting of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 and SEQ ID NO:62.
3. An isolated nucleic acid molecule comprising a polynucleotide at least 95% identical to the isolated nucleic acid molecule of claim 1.
4. An isolated nucleic acid molecule at least ten bases in length that is hybridizable to the isolated nucleic acid molecule of claim 1 under stringent conditions.
5. An isolated nucleic acid molecule encoding the polypeptide of claim 2.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 88 -

6. An isolated nucleic acid molecule encoding a fragment of the polypeptide of claim 2.
7. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide epitope of the polypeptide of claim 2.
- 5 8. The polypeptide of claim 2 wherein the polypeptide has biological activity.
9. An isolated nucleic acid encoding a species homologue of the polypeptide of claim 2.
10. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein the nucleotide sequence comprises sequential nucleotide deletions from either the C-terminus or the N-terminus.
- 10 11. A recombinant vector comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 1.
12. A recombinant host cell comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 1.
- 15 13. A method of making the recombinant host cell of claim 12.
14. The recombinant host cell of claim 12 comprising vector sequences.
15. The isolated polypeptide of claim 2, wherein the isolated polypeptide comprises sequential amino acid deletions from either the C-terminus or the N-terminus.
16. An isolated antibody that binds specifically to the isolated polypeptide of claim 2.
- 20 17. The isolated antibody of claim 16 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
18. The isolated antibody of claim 16 wherein the antibody is a polyclonal antibody.
- 25 19. A recombinant host cell that expresses the isolated polypeptide of claim 2.
20. An isolated polypeptide produced by the steps of:
 - (a) culturing the recombinant host cell of claim 14 under conditions such that said polypeptide is expressed; and
 - (b) isolating the polypeptide.
- 30 21. A method for preventing, treating, or ameliorating a medical condition, comprising administering to a mammalian subject a therapeutically effective amount of the polypeptide of claim 2 or the polynucleotide of claim 1.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 89 -

22. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

- (a) determining the presence or absence of a mutation in the polynucleotide of claim 1; and
- 5 (b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or absence of said mutation.

23. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

- (a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of claim 2 in
- 10 a biological sample; and
- (b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

24. A method for identifying a binding partner to the polypeptide of claim 2 comprising:

- 15 (a) contacting the polypeptide of claim 2 with a binding partner; and
- (b) determining whether the binding partner effects an activity of the polypeptide.

25. The gene corresponding to the cDNA sequence of the isolated nucleic acid of claim 1.

20 26. A method of identifying an activity of an expressed polypeptide in a biological assay, wherein the method comprises:

- (a) expressing the polypeptide of claim 2 in a cell;
- (b) isolating the expressed polypeptide;
- (c) testing the expressed polypeptide for an activity in a biological assay; and
- 25 (d) identifying the activity of the expressed polypeptide based on the test results.

27. A substantially pure isolated DNA molecule suitable for use as a probe for genes regulated in gastrointestinal inflammation, chosen from the group consisting of the DNA molecules identified in Table I, having a 5' partial nucleotide sequence and length as described by their digital address, and having a characteristic regulation pattern in

30 gastrointestinal inflammation.

28. A kit suitable for detecting the presence of the polypeptide of the claim 2 in a mammalian tissue sample comprising a first antibody which immunoreacts with a mammalian protein encoded by a gene corresponding to the polynucleotide of claim 1 or with

WO 00/77166

PCT/US00/15973

- 90 -

a polypeptide of claim 2 in an amount sufficient for at least one assay, instructions for use and suitable packaging material.

29. A kit of claim 28 further comprising a second antibody that binds to the first antibody.

5 30. The kit of claim 29 wherein the second antibody is labeled.

31. The kit of claim 30 wherein the label comprises enzymes, radioisotopes, fluorescent compounds, colloidal metals, chemiluminescent compounds, phosphorescent compounds, or bioluminescent compounds.

32. A kit for suitable for detecting the presence of a gene regulated in
10 gastrointestinal inflammation, comprising:
at least one polynucleotide of claims 1 or 4, or fragment thereof having at least 10
contiguous bases, in an amount sufficient for at least one assay;
label means;
instructions for use; and
15 suitable packaging material.

33. An isolated polypeptide comprising SEQ ID NO:129.

WO 00/77166

PCT/US00/15973

1/8

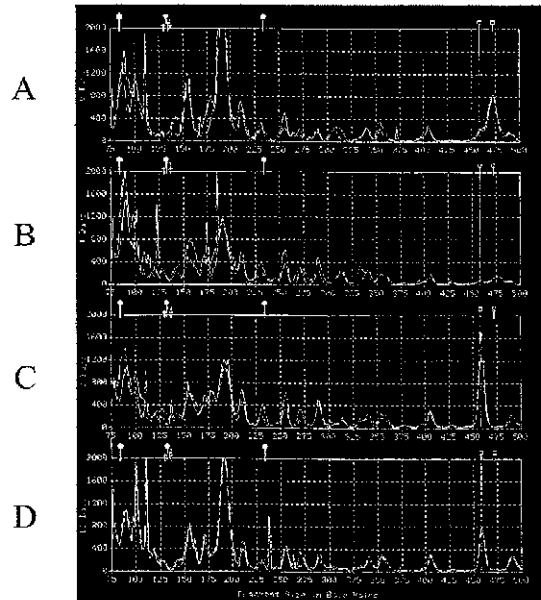


Fig. 1

WO 00/77166

PCT/US00/15973

2/8

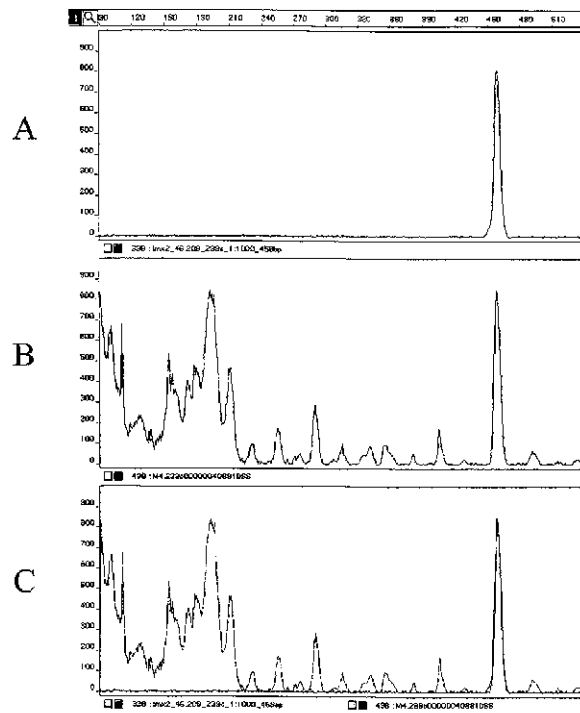


Fig. 2

WO 00/77166

PCT/US00/15973

3/8

IMX2-46.208

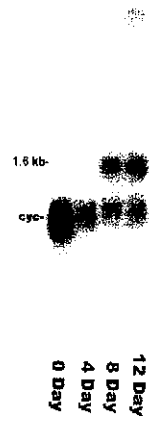


Fig. 3

WO 00/77166

PCT/US00/15973

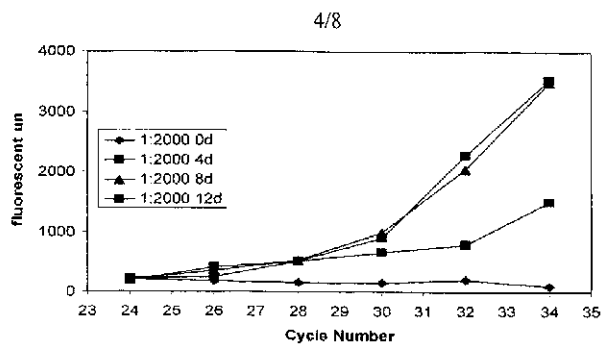


Fig. 4

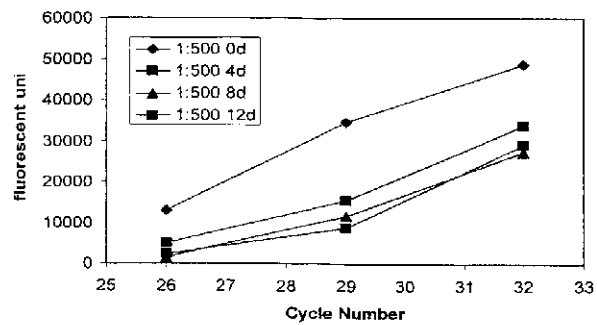
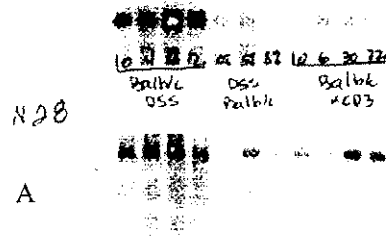


Fig. 5

WO 00/77166

PCT/US00/15973

5/8



overexposed

CRP-ductin probe N28

B

lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
probe	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP	CRP
ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin	ductin

50% immersion 50°C hbp.

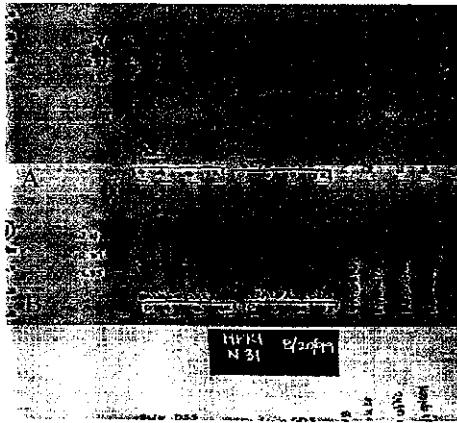
IMX2_17 CRP-ductin

Fig. 6

WO 00/77166

PCT/US00/15973

6/8



IMX2_22 HPK1

Fig. 7

100

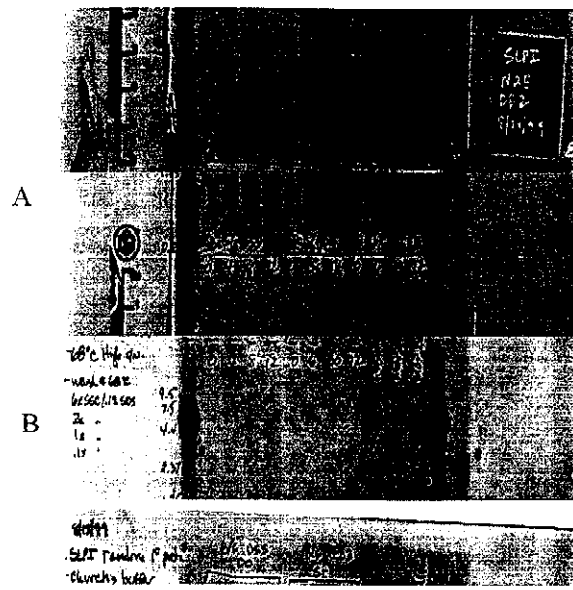


Fig. 8

WO 00/77166

PCT/US99/15973

8/8



IMX2_33 SLPI

Fig. 9

WO 00/77166

PCT/US00/15973

1

SEQUENCE LISTING

5 <110> Viney, Joanne L.
Sims, John E.
DuBose, Robert F.
Hasel, Karl W.
10 Hilbush, Brian S.
Buchner, Robert R.

<120> Gene Expression Modulated In Gastrointestinal Inflammation

<130> 99,104-A

15 <140> 60/136,487
<141> 1999-06-12

<150>
<151> 2000 06-03
20 <160> 129

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1
<211> 270
<212> DNA
<213> Mus musculus

30 <220>
<221> IMX2_4
<400> 1
cggaacaccca gacaggacga agaggctcac attcctaac tctttccag tgcctcccca 60
acggtcactt actctctggc tgcgtgcttt attttttaga gagatgata tattttttgt 120
35 tgcgtgtgtt gttcttagat agggcttccg tctgtagccc tggctttcct ggaactcact 180
gtcttagagca agccacccct aaactcatag attcaccctg cctcgccctc agatcgccag 240
aattaaagt actgcctaca caccacaaaa 270

<210> 2
40 <211> 964
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
45 <221> IMX2_4 Extended Sequence
<400> 2
ggctggcagg gagccccaag tcccctggc ctgggcacg ttcccaagcc ctacatggga 60
ggagagatgc cctggacat cctcctgttt gcatctgccc caactggat cttggcactc 120
tccctgaacc tggctggagg tctgctgttc taagggtcgg tggccatcac agtgcctgtg 180
50 agaaaagcta aagcacaaga ctacagaag cagaagagcc ggaatcctg ctgggctcag 240
atcaacttca caatacaga catgtccttt gataactctc tgtttgtat ctccacgaaa 300
atgactcagg aagactcagt ggcacacct gactcaggg ctgggaagag gccactcttc 360
gcactacccc ctccggaagcc ccttgagttc agcactctcc aggaatgcca ctgagcctga 420
cgaatgagga ccactttatc cagttccttc cctccactg ccagaggtcg cacactctgc 480
55 cagagacttg gcagtggaag tagggtaggg ttgggaacca agcctatagt tctttagaga 540
agcactggcc aaaggaaggg gactcctaga gtgttaact tcttcacaga agacaagaaa 600
atgagttagg gcatcagccc tgggctagac agagagccag aactcttcca cagattccca 660
gctcacgggg gaagtcacta ttgaatcgg acaccagtc aggtacaga ggtctacatt 720
ctctaacccc ttccagtgcc ttcctcaagg gtcaactact tccagactgc gtgttttatt 780
60 tttagaggag atgtgtatat ttttcttgc tgttgttctt cctagatagg gtctcactgt 840
gtacccctgg cttttctgga actcactgtc tagagcaagc cagcccaaaa ctcatagatc 900

WO/00/77166

PCT/US00/15973

2

```

caccctgccttc tgcctccaga tgcctcgaat taaggttact gctataacac ctacacacac 960
aaaa 964

<210> 3
<211> 192
<212> DNA
<213> Mus musculus

10 <220>
<223> IMX2_17
<400> 3
cgggctcttg gctattgtt ctgagtgacg tggcctgtac aggcacagag gactatctgt 60
ggagctgctc tcaccgaggg tggctctctc ataactgttg acaccatggg gatgctggag 120
tcattctgtc agatgcccc aaaccagagca caaccagggc agatctgttg cctactacta 180
ctaccccaaa aa 192

<210> 4
<211> 192
<212> DNA
<213> Mus musculus

20 <220>
<223> IMX2_22
<400> 4
cggtagctgg ggagacaggg cccacggatg accctacggc cccacagcac ctctacatcc 60
aggatgagc cattgaggg gcattgggaaa cggatgctg cagactccta acagacggac 120
tagtggtcac gacatgacct tatctcccaa taacttgac tttagtcttg cctactctgaa 180
aaa 192

30 <210> 5
<211> 115
<212> DNA
<213> Mus musculus

35 <220>
<223> IMX2_28
<400> 5
cggtagcttc cacaaagact ttggagagg agtttaagaa gacgcacaga catcacagg 60
cattctctga ccattctcaa gggctgttgt gctgctctc acggaaggcc aaaaa 115

40 <210> 6
<211> 135
<212> DNA
<213> Mus musculus

45 <220>
<223> IMX2_36
<400> 6
cggcattctc agatgctcac tcaacaagcc ctctctggga ccaggactcc cgttgggaata 60
cagatccaca gggtagctcc ctgagatcac tgacattgta ctattctct ccccaataa 120
aagacagagc aaaa 135

50 <210> 7
<211> 474
<212> DNA
<213> Mus musculus

60 <220>
<223> IMX2_36 Extended Sequence
<400> 7
ctttcccaag atgcgactgt tcttcctgga gccctggctt actggctggg attgtctctg 60

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

3

```

gtgacttggg  gttgactctg  ctgattgccc  tggctgtgta  ctctctgggc  cgcctggctc  120
cccagggtca  agggacagcg  gaagggtccc  ggaacaaca  ccttgcctgag  actgagtcgc  130
cttatccagg  gcttcagggt  cagagaccag  aagtatccag  tgaacctcaac  acacagaggc  240
aatattacag  atgggcccac  tctatgccc  tccgctggc  gatgcccaga  tccgctcatt  300
ccagatgcct  acctcaacag  cctctctctg  gatcaggact  cccgttggaa  tccagatcca  360
cagggtcact  cctcgagata  tctgacattg  taccatttct  gtcccacaa  aaaaagacaga  420
gcacaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  aaggggcggc  cgca  474

<210> 8
<211> 221
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> IMX2_43
<400> 8
cggcacaacc  tactcagggt  gcaaaaggct  tatgtgactt  atgtgactgt  agaaaaaga  60
gaaatgagtg  atctctctgt  ggtactagc  agatttccac  tctgcccaga  ccagtcggca  120
gggtttcgag  gaagtccttg  aaaaactctg  ctcaagaagc  aatgacagga  cccatgactt  180
ttttttttta  agtcaataaa  acaatatatt  gaacagaaaa  a  221

<210> 9
<211> 1377
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> IMX2_43 Extended sequence
<400> 9
ccgtctcttg  ctctccaccc  tgggaetggt  cctgtgcttg  gctctgcaat  tatccccctc  60
cctctctctg  agtgataatg  ggtccttgct  ggctcttgat  aacatctata  cctccgacat  120
cttggaaatc  agcactatgg  ctacagctct  cggcgggggt  gtaacctata  cagtgacggc  180
ccccctgaac  gattcagtcg  ctgcctgctg  cctgaaagca  gtgaaggagg  acccagctcc  240
agtggggccc  tggagtggaa  catatgagaa  gtgcaacgac  agcagtgctt  actataactt  300
gacatcccaa  agccagtggg  tcttccagac  aaactggaca  gtctctactt  cccagggatg  360
gacctaaatc  aacctgcagg  tccatcctgt  agtccatcgt  acagctctga  agtccatcgt  420
gaaaagggtc  aaggtccaa  cctccagctc  aaacctctat  cctgagagtt  ctgagacctg  480
ccagaccata  aactgacttc  aaactctgaa  caaacccaa  actacagcca  aggacacagc  540
caacacacaa  gccgtgacca  cagccaatat  catagccaat  accacagcgg  tgaaccacgc  600
aaagaccaca  gccaaaagcc  tggaccatcg  tactctcggt  agcctccttg  cgggtgacct  660
ccatcctctg  ctgtgttttc  tcatagtaa  actcctcttc  taagaaaaac  tgggaagaca  720
gactcccaac  ctccaggtca  tccctcagag  ctcatctcag  gccagtgtct  aaacatacct  780
gaatgaagg  tttatgtcct  cagtcctgag  ctccaccacc  ttggaacca  gacttcgaac  840
cttagtgac  ttgaggata  caaatgtctg  cctggacttt  tcaaggacaa  aattccgttt  900
cttgttaata  cttagttcaa  ccatcctgct  cgttaaccga  agttctgact  cttagtttaa  960
cttgttgaca  gccaatctga  actctgtgtt  ctggccaaag  gtattctcct  gagctccttg  1020
gggtgtgggg  tgggagggg  atgactcttc  ttactcttca  aaatgatttc  agatttcttg  1080
ccaaacctac  tcagggtgca  aaggacttat  gtgactatg  tgaactgagg  aaaaaggaaa  1140
acagtgatc  atcctgtggc  tactagcaga  ttccactgt  gttccagcca  gtggtaggt  1200
tttgaaggaa  gtatctgaaa  actgtgcttc  agaagccaat  gacaggacc  atgacttttt  1260
ttttctaat  caataaaca  atacttgaa  caagaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  1320
aaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  aaaaaaaa  1377

<210> 10
<211> 407
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> IMX2_46
<400> 10

```

WO 00/71166

PCT/US00/15973

4

5 cggggcgcac ggggaccaga cagcttgggt ccggcggagg ctccgctctt caacgcctca 60
 gcttcagcgt ccccgcttc tccgcaggta nttgaagctc cttggcccca caccacatct 120
 ctgaagatga gctgtgaata cgtgagcttg ggtaccagc ctgctgtcaa ccgggaagac 180
 cctgattcag atgattacat caatattcct gaccatcttc atctccctag ctatgcccac 240
 gggccagatc ctccatgcc atgagttctg cctgttttgt gatgtctagc aagttctcct 300
 tataggatcc ctgtcatggc gtatgtccta taccctaaag cgactctcau ctgaciatct 360
 gaattgcttg agaatgatca attccaggct aattttctac ccaaaaaa 407

 <210> 11
 <211> 655
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> IMX2_46 Extended sequence
 15 <400> 11
 gctcttttct tggtagcttc ttgaagcttc ctcccgagct gggggccgac tagcgatgag 60
 gaggcgaggc cggggggctt cccgcccgtt vcccacccag cggcgggatg cctcgagag 120
 accgctctcg cagacacacg tctacagcgc ctgccccggg cgcgcacggg gaccagacag 180
 20 cttgggtcca ggggaggctc cgtctctcaa agcccagac tcagctctcc ccgattctcc 240
 gcaagtactt gaagctctct ggcccacac cccattctct aagatgagct gtcgaatct 300
 agttctgggc taccagcttc ctgtcaacct ggaagacct gattcagatg attacatcaa 360
 tactctcgac ccatctcttc tccctagcta tggcccaggg cccagatctt catgccaatg 420
 25 agttctggct gtttgtgat gtttagcag ttttctctat aggatccctg ccatggcgta 480
 tgcctctatc cctcagctga cctcacctg actatctgaa tgccttgaga atgatcaatt 540
 acaggctaat tttcacccc attgaagccc cctgcattca tttgcgagag ccttggataa 600
 gacgtgcaga acatccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagtatg cggcc 655

 <210> 12
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> IMX2_48
 35 <400> 12
 cggctcttca gtcctgactt ggtctgtctg ctgctgcttg ccaccaacca ccaggtatca 60
 ggggtctctt tggccagtga acttcgctgt caalgcttga agacctgtct aagggttgac 120
 ttcaagaaca tccagagctt gactgtgag ccccccaggc cccatgtgag ccagacagaa 180
 40 gtcatagcac ctctcaaggg cgttcaaaa gtttgcttg accctgaagc cccctggatt 240
 cagaaaatca tccaaaagt wctgaacaaa ggcaaggcta actgaacctg aaaggaggag 300
 cctgggtgac tgcctctcaa cggaaagacc ataaaaa 337

 <210> 13
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

 <220>
 <223> IMX2_55
 50 <400> 13
 cggcccgatc ctatctgaac taggagctct gctctgggat tcagaaatc tggctgaatg 60
 gaaaaccact gggagggaaa ggtctgaaca agggatacac tctgggggt gatgaatga 120
 tcaactctagg ccaagagcgc gattctctat ggggaaattt tgagcaaaag caatcccttg 180
 55 ttggggagat ataggatggt tctttgttgg accatgtggt ccccttagaa aaggtatcag 240
 acagctgtaa caatggcaac cttaaaaaat ggaagctct caattatgaa gacaaaggct 300
 atgtgtggac taagcccaaa ctgtggcctt aagctaatgt tcttatgaaa tataagtctg 360
 cttttggttc tgttaaaatg ataactgtca tgcattaaa aaagcaaga aaaa 414

 <210> 14
 <211> 797

WO 00/77166

PCT/US00/15973

5

```

<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> INX2_55 Extended Sequence
<400> 14
gcacaaatgga gaagcttatt gtgggcatcc tgtttctctc tgttctctca ggaagtgtag 60
cacaaacaga catgaagggt aaggcatatta ttttctctca agaactcatcc actgctcagt 120
gtccctgata ccgaagggtga ggaagtcnact gcaagaacttc actctgtgta tgaagccctt 180
cacagacctg acacggccctt acagcatctt ctctcacaac caaagaacta aggaacaatga 240
gattctcttc ttctgggaaa atataggaga atacatgttc tatgttggga attctgttagc 300
cattttcaca gaaacacaaa atcttctctga tccagbctdgt acctgtgctga accgggagtc 360
tgcctctggg atcgagaaat tctggctgaa tggaaaaacc ctggggggga aaggtttgaa 420
aaagggatcc atggtggggg gtgatgcaat gactctata ggacaagagc aggaattctt 480
tgggggaaat ttgatgcga agcaatctct tgttggggag atatgggatg ttctctctgt 540
ggaccatgtg gtcccccctg aagaggctac agacagctgt acaaatggca accctataaa 600
ctggcaagct cttaactatg aagacaaatg ctatgtggtg attaagccca acctgtggcc 660
ttaagctaat tgcctctatg aatataagtc tgcctttggc tctgttaaaa tgaataatgt 720
cattgcattc aaaaagcaas gaactgagaa aaaaaaaaaa naaaaaaaaa aaaaaaaaaa 780
aaaaaaaag ggcggcc 797

<210> 15
<211> 125
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> INX2_57
<400> 15
cggcgatgta caactgggtc agcaagttca gtacctggat caaccaagtc atggcctaca 60
actaaactgt ccacagatcc gtcccacac tcaactaat aaacatactc gtctcagttc 120
aaaaa 125

<210> 16
<211> 440
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> INX2_57 Extended sequence
<400> 15
cmttnggggc tcaactgtgt caccactggc tgggggcgaa tcaagtggnt gggcaatgtg 60
acaccagctc gctcgagaca agtngttcta cccctggtrc ctggaatca gtgtggcag 120
tactgggggt caccgattac ccatgcatg atabgtgcag gtggtcagg cgcctctca 180
tgrcnggggt actcaggagg cctctctgtc tggcagaagg gaaacacctg ggtgcttatt 240
gggatgtctt cctggggcac taagaactgc aactataaag caacggcat gtacactcgg 300
gtcagcaagt tcagtacctg gatcaaccac gtcatggcct acaactaaac tgtccacaga 360
tccgttcccc atctcaatct aataaacata ctctgtctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 420
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 440

<210> 17
<211> 223
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> INX2_61
<400> 17
ggggtatggc agggatctgg agctcctggg atggggcgct ctctctcttt tcatcttga 60
ccagcatgtc agtctgtaaa gctccaaacc catgctcaga aggcaggagg gcaacatagt 120
gaagacacaa gcccaaaacc actggctgac ttttatgtgt ggcraggggt ggggtccagt 180

```

WO 0077166 PCT/US00/15973

6

gagcctccca tcaaatctct gtacacaccc atcccccaaa aaa 223

<210> 18
<211> 1225
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> IMX2_51 Extended sequence

10 <400> 18

aggaattcgg	cacgaggcat	cctactctctg	tgttggcaat	ggaagcagta	caaaactgac	60
tccacacaga	ccaagtcact	cacgttggct	ggatctctga	cacaccaggg	tcctgtgctc	120
ttcggtttat	tctccatccc	tacactacac	tgggactcta	tggcaggcga	tgagctagct	180
atgctcgctt	tctctgtgct	ctctgagtatg	gcagggatct	ggagctcctg	ggatggcgcg	240
ctctctcttc	ttctatttgt	gaccagcatg	tcagtctgtt	aagctccaac	cccatgctca	300
gaaggcaggga	gggcccacata	gtgagacac	cagcccacaa	ccactggctg	cctcttatgt	360
gtggctaggg	gtgggtccca	gtgagcttcc	natcaaatct	ctgtacacaa	ccatccctct	420
aaaaaaaaagc	tatccccact	gtaaagggcc	cagacctcac	attcaggaac	aggtcacagg	480
tggtcatgaa	caaaattata	tgttgtttct	tgtctctgtg	gttttttttt	ttacactatg	540
aatataattat	ttatactatt	tcattagcaag	ggagagggat	atttgcctac	cttttttttc	600
ttttgaagat	tttgttatat	tttttaaga	ttatgttttt	atgtttctgg	gtcaatggag	660
caaccactgc	cctgacaca	gtgacacccc	aagcagcaca	gcgcgcctcg	gtccttctct	720
tcttctcttg	ggagctttct	ttctgatgac	tcaggaaact	tgtgtgaatg	agggagaaag	780
cttgagatga	agcttgtaac	caccttagct	ctacaataat	ctgtcttctt	agaaacaaac	840
ttgaggttgt	atccccaggg	gaaacgggaa	tcagatacag	gacctatgct	ttcatatgta	900
aaocgtgctt	gaagccgctt	gagtgaattgt	ttgaactgtt	cttaaatctc	ctgacctttc	960
gtaaaaaagt	aaatcaaaaa	taattaaagaa	ataaaagtta	aaatagacac	agaaactgtg	1020
aatgcaagaa	tatgcaaatc	tactgtgggt	ggtaattctc	gcctgtaatc	ccagttctatg	1080
gaaggctgaa	gcgggaagat	tgaataatcc	agaccagctt	gggcaaaagg	gtctaaagct	1140
ctgctcaac	caaaaacaata	ataaatatct	acaccagact	cgaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	1200
aaactcgagg	gggggcgggt	accca				1225

<210> 19
<211> 427
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<223> IMX2_53

40 <400> 19

cggtgataag	agcaactctg	cacgttggcg	gtaccaggta	actgtcacc	tgcttgaca	60
gaaggtcact	gggcacattc	tggttctctt	gttggaaat	ggaggaaact	ctaaactagt	120
tgaagttttc	aaaggctctc	tgcaagcagg	tactctcac	gtcaatgaat	tgaactctga	180
tgggaagctt	ggagattctg	agaaggttaa	atttatcttg	tacacacatg	tgatcaacct	240
aaactctacc	aaagtgggag	atcaagagat	cacagtgaaa	agaaaagatg	gcagagtgtt	300
caactcttgt	agtcaagaga	cagtgaagga	agcgtctctg	ctcacactgt	ctccatgtta	360
ggaggctgct	gctgtgtgaa	caaccaagtc	tactgttgta	ataaaagctt	agtattaaag	420
ccaaaaaa						427

<210> 20
<211> 180
<212> DNA
<213> Mus musculus

55 <220>
<223> IMX2_74

<400> 20

cggtctcaga	gattascata	gtggacaaag	ggcttctggg	ctccgcttcc	actctacaaa	60
cttttttggg	actccctctc	cctctctatg	tcttaaacag	caatgcttaa	caagctagaa	120
atgtctcttc	ttgactactg	gtctccctgc	aaaccagtaa	agtcttggag	ccacacaaaa	180

WO 00/77166

PCT/US00/15973

7

```

<210> 21
<211> 147
<212> DNA
5 <213> Mus musculus

<220>
<223> IMX2_33
<400> 21
10 cggctccctg tatcccaggc ttggatcctg tggaccaggg ttactgtttt accactaaca 60
tctctttttg gctccagcatt caccgatctt tagggaaatg ctgttcggaga gcaataaata 120
aaacgcatte atctctctat gcaaaaaa 147

15 <210> 22
<211> 124
<212> DNA
<213> Mus musculus

20 <220>
<223> IMX2_64
<400> 22
cggctggcctt acgaaaaggc gagccgtcca aggtaggaca gatgattggg gtttaagtcg 60
aaacagggtat cctccagaga acgtggggat ggaacacctc ctttctaagg agaaaaatga 120
aaaa 124

30 <210> 23
<211> 140
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
35 <223> IMX2_21
<400> 23
cggtaagtga aaaggggagg ggcctggcag tatccagagt accacagagc acgtggaaac 60
ttctgggaat gagcgggga cccccgtaa ggcataatc tactcagcga ccgatatgtg 120
acagtactgt gaaggcadas 140

40 <210> 24
<211> 233
<212> DNA
<213> Mus musculus

45 <220>
<223> IMX2_49
<400> 24
cgggatgttg gaagtttaga aacgtttttt ggaactgata taggcacatg tatcgggata 60
acatgatcga ggaatgtgat tcttcaaaag tttgtcctgc ggtaaaagag aaagagaaaa 120
tcttcaaatc aagcggcctg gattagtctg tggctccctt gaggatcca catggctcac 160
ttggcccaat tttttcaag aggaaaatgg ggaatctctc taatgcagaa aaa 223

55 <210> 25
<211> 209
<212> DNA
<213> Mus musculus

60 <220>
<223> IMX2_62
<400> 25

```


WO 00/77166

PCT/US00/15973

8

```

5  eggctcctggc agacagacat gctcattggg tcagctttgc atcagcacag acctcttcta 60
   acgaagagga ttgtgtatc aaagcttat tgaacactgc cattgacgta gattcattag 120
   aagcaaacctc acutttagat gaagtcaggga tcaaaagaagt tataaaggaag gcaaggaatga 180
   agctgaatag gagcaaatc aaccaaaaa 209
6  <210> 26
   <211> 348
   <212> DNA
   <213> Mus musculus
10 <220>
   <223> IMX2_5
15 <400> 26
   cggacacacat agagaccctg atctctgggc tgggcttggg tctgggcott atgggctgcc 60
   tctctgggcat cgtgtccatg atcacaggta cactcaggcc cagtatccgc aggtcaacttc 120
   tcttctgaga aacctctgag agatgatttc tggcggactc ctggaagctt ctgcgtgctc 180
   agcggcagcc ttgtacagtg ttgacctcga gtggcatcna cctctgttca ccaaatccca 240
   ggagaaacatt gtgggcgcag tctcttgcgc tggtaaccca tttaactcac agctccagtg 300
   ccaaccacag ctctggcagc cgcactaaat tctcttaaga gtcaaaaa 348
20 <210> 27
   <211> 310
   <212> DNA
   <213> Mus musculus
25 <220>
   <223> IMX2_6
   <400> 27
   cggacactcac cgaaccagccc atcccagacc cgaaccacac ctgggtatacc gaaggaggca 60
   gcttttttga agaaggacag cgaaggctg gggcagcagt gacgactgag accgaggtac 120
   tctggggcag ggcctgcaca gctggaaact cagcccagcg agccgaactg atcgactca 180
   ccaagccctt gaaaatggca gaaggtaaga agctaaatgt ttatactgac agccgatatg 240
   ctctcggcac ggcctatgct catggagaaa tctataggag gcgagggttg ctgacctcag 300
   agggcaaaaa 310
35 <210> 28
   <211> 117
   <212> DNA
   <213> Mus musculus
40 <220>
   <223> IMX2_7
   <400> 28
   cggactcggc aaatgtgaag aagctgatga aagaatggga aaagaagatc agccaaaaga 60
   aaaagcaaaa gagggggaaa aacatcaaaa gaacatgaag aacagaaaac ccaaaaa 117
45 <210> 29
   <211> 234
   <212> DNA
   <213> Mus musculus
50 <220>
   <223> IMX2_8
55 <400> 29
   cggagaccca catcgatcca agagtgaagc acgacgcgca atcgggagaa acaaagcaga 60
   caggaaatgt ttacacgcgg ggcaagacag ttactgatac gggcagacac agaaacagtg 120
   aacacaacga gccactgcga caaaaaaaaa agtgcactcg ggaatgcagt ggaatgaaca 180
   ctctggaccc gcagacagga gtgaagtact cgggactctc caactcccca aaaa 234
60

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

9

<210> 30
 <211> 421
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> IMX2_11
 <400> 30
 10 cggagtcgct atgtgtccaa gccagactaa ccancataga gctgttgcat gattttgatg 60
 agtaacccat gccatccage aggtcaccaa gtccaggctca gatgaggtgc aggcaggggca 120
 gcaacgcgaag ttcacacagc acatcaagtg cagaacgcgc ctgaagctgc agaaaggga 180
 gaagtcacct atgtgggggc tctctctga cctctgggga gaaagggcca acaccagcta 240
 catcattggg aaggacacgt gggcggagca ctggcctgag gcggaagaat gccaggatca 300
 15 gaagtaccag aaacagtgct aaggaactgg ggcattcacc gaattctatg tggtttatgg 360
 ttgtcccaac tgacacacgc ccagccctct aataaagctt cagttgtatt tcacacaaa 420
 a 421
 <210> 31
 <211> 191
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> IMX2_12
 <400> 31
 cggagtcggca aagaccccaa ccacttcaga cctgtgggc tgcctaaaag atctcgagtc 60
 tctctctctc gttgtccca gtcargctgc ccccgagaa gaggagcaac taactgggtg 120
 30 agatattttc caaacctctg atccctaaac atcccaatgt gctgaataaa tactctgcaa 180
 atgcagaaaa a 191
 <210> 32
 <211> 173
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> IMX2_13
 <400> 32
 cggatcacgc agcagctggg ccagctgacc ctggaaaatc tccagatgct acccgagagc 60
 gaggatgagg agactataga caccgagtcg gaattccacg aggatgagat gccctatgat 120
 45 gacctgtgct ttggaggcca gcgtctgaca ttataagctg aaagtggcaa aaa 173
 <210> 33
 <211> 311
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 50
 <220>
 <221> IMX2_15
 <400> 33
 cgggcccgat atgctaacgt gcttcctgac cgtgaccttg aggtggacac ccccccaag 60
 agcttgagtc agcagattga gaacatctgc agtcccgag agtcccgcaa gaacccctgc 120
 cgcacatgcc gcgacctcaa gatgtccac tctgactgga agagtcgaga gtactggatc 180
 gacctcaacc aaggctgcga ctgggacgca atcaaggtct actgcaacat ggagacaggt 240
 60 cagacctgtg tgttccctac ccagccctct gtgcctcaga aqaactggtt catcagcccg 300
 aaccccaaaa a 311

WO 00/77166

PCT/US00/15973

10

```

<210> 34
<211> 138
<212> DNA
5 <213> Mus musculus

<220>
<223> IMX2_16

10 <400> 34
    cgggcgatcg tgggtgatgc ctttaaccac agcacttggg aggcagaggc agttggattt    60
    ctgagttcga ggcacgcttg gtctataaag tgagttccag gtcagccagg gctatacaga    120
    gaaattctct cccaaaaa
    gaaattctct cccaaaaa    138

15 <210> 35
    <211> 99
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

20 <220>
    <223> IMX2_20
    <400> 35
    cggggggtgac aggcgtgagg ccttaggaact ctggctctct gagctcagct cagggttagg    60
    gctcactggg attagaggct ctgctctaca ggataaaaa    99

25 <210> 36
    <211> 109
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

    <220>
    <223> IMX2_23
35 <400> 36
    cggctcatggg aactcagtat tattaatagg caccacatga ttccagaact agatagccct    60
    cccacaccaa gaagaacgtg agaggaagta aggtccactt atgcataaaa    109

40 <210> 37
    <211> 313
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

    <220>
    <223> IMX2_24
45 <400> 37
    cggctctccat ggcctgcacg tagtggttc gccatggttg gatacctttt tcccttgaac    60
    caaaggagaga gatgtggaaa tcgtctcttc tgttctcttt ttccagaaaa gcacagaaaa    120
    aatctaccttc agtaaatctc tcactctgco agccaagtga gggcttgagc tcagccaaac    180
    cctactgtct cttagagact cctactctac tccaagggtg gagctgttcc tctctgggac    240
    tgtctacttc accctccagt caggaccoga tccatagcaa atgggaagata cagctctctt    300
    gcttaaccaa aaa
    gcttaaccaa aaa    313

55 <210> 38
    <211> 325
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

    <220>
    <223> IMX2_25
60 <400> 38

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

11

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

cgggtgacccat cggagaacaaa gggatccacac cccaaaccta caagggtccta agcacactta 60
 ccatctctga aatcgactgg ctgaacctga atgtgtacac ctgcccgttg gatcacaggg 120
 gtctacactt cttgaagAAC gtgtccctca catgtgtctgc cagtcctctc acagacatcc 180
 taaccttcaac catccccccc tcttttgcgc acatctctct cagcaagtcc gctaacctga 240
 cctctctggg ctcaaaacctg gcaacctatg aaaccttgga tatctcttgg gcttctcaaa 300
 gtgggaacc actggaacc aaaaa 325

<210> 39
 <211> 294
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> IMX2_26
 <400> 39

cgggtgacctg tctgtcttga gggacctga tggccacaag ctgcgtgttg atcccgtaa 60
 ctccaagctc ctgaagcaact gctgtgtgtt gaccttggct agccaccacc ctgcccattt 120
 caccctcgcg gtgcattgctt cctcggataa attccttggc tctgtgagca cagtgtctga 180
 ctccaagtaac cgttaagctg ccttcttggg gcttctgctt ctggccatgc ccttctcttc 240
 cctccttgcac ctgtaccttc tggctcttga ataaagcctg agtcggaata aaaa 294

<210> 40
 <211> 288
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> IMX2_35
 <400> 40

cgggtgacctg ggggcaagg gggcggatc cctgtgagct caggggccag ctgggtaca 60
 ggttgagttg caggacagct agggctacac aaagaagccc tgtcttgaga gacaaaacc 120
 ccaattctaa ccaacaaac caaaaacaa caaaaaaca aaacccaac aaacagggtt 180
 ttctggagtg ggtgtgtgtt cagaacacct gcttaatatg ggcaatgctc tgggttccat 240
 ctccgactta cagaactaa taaaaacctc ttttgggat aataaaaa 288

<210> 41
 <211> 172
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> IMX2_39
 <400> 41

cggataaactg catgtgcatg tgcgtcatgc caatgagcca agtcctggag agggagacag 60
 caattgtgtg accaggattt accactccca tgttgatgct ccaaaagata ttgcatcagg 120
 actcatagga cctccaatcc tctgtaaaaa aggtctctota tataaggaaa aa 172

<210> 42
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <223> IMX2_40
 <400> 42

cggcattgta gaacagtgtt tatcaatgag ttacaaaaa 39

<210> 43
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

WO 00/77166

PCT/US00/15973

1a

```

<220>
<223> IMX2_42
<400> 43
5  cggccaaact ctcattacc atagatgggg aaaccaaagt attccacgac aaacccaat 60
   taccacatta catttccaag aatccagccc tccaaggaat aataacagga aaaaaacaa 120
   tacaaggaga gaaatccatgc cctegaaaaa 150

<210> 44
<211> 39
<212> DNA
<213> Mus musculus

15 <220>
    <223> IMX2_51
    <400> 44
    cggtagggtg gagtgctgcc agggaaaaa 39

20 <210> 45
    <211> 291
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

25 <220>
    <223> IMX2_52
    <400> 45
    cgggtgtcctg tctgctctga ggcacotgca tgcccacaag ctgcgtgtgg atcccgtaaa 60
    cctcaagctc ctgagccact gctgctgagt gaccttggct agccacaccc ctgccgattt 120
    cccctccgag ctgcatgctt ctctggataa attccttgcg tctgtgagca ccgtgctgac 180
    ctcaagtaac cgttaagctg cctctctggg ggcttgcttt ctggctatgc cctctctctc 240
    tcccttgac ctgtacctct tggctcttga ataaagctcg agtaggaaaa a 291

35 <210> 46
    <211> 283
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

40 <220>
    <223> IMX2_53
    <400> 46
    cgggtcccat atctttgagg gcccctggac cgagggcccg atgancogtt ttttggcaca 60
    tcaagttagt gactatcagg tgggtgaagg actctgccc ttatatccct caccagagca 120
    cctcgtcag ctctatgata acccttgcca caattagagc aaagagtgag agtccctccc 180
    tgtttatctg gagctctgca atctttctta aaatgcccag gcttttcgca attaaaacat 240
    gtcctctgac catctctgct catggagcgg tcttgagatt gga 283

50 <210> 47
    <211> 421
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

55 <220>
    <223> IMX2_58
    <400> 47
    cggcgggtat ctctgtgaac tgggagctcg ctctcgggat tgcagaattt tgggtgaatg 60
    gaaaaccact gggagggaaa ggtctgaaga agggatacac tctggggggt gatgcaatga 120
    tcaatctagg acaagagcag gattctatg ggggaatttt tgatgcaaa gaaacctttg 180
    ctggggagag atgggatggt tccctctgag accatgtggt ccccttagaa aaggtatcag 240
    acagctgtaa caatggcaac cttaaaact ggcagctctt taattatgaa gacaatggct 300
    atcgggtgac taagcccaaa ctgtggcctt aagctaatgt ccttatgaaa tataagctcg 360

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

13

```

ctttttgggttc tggtaaaatg ataattgggca ttgcattaaa aaagcaaaag aatgtgaaaa 420
a 421

5 <210> 43
  <211> 271
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

10 <220>
  <223> IMX2_59
  <400> 48
  cggcgggcgaat atccagctctg gctgcaaacgg tgaactctgga ggacccctca actgtccccc 60
  tgacaatgggc acccgggcagg tccacgggtgt gaccagcttt gtgtccctct tgggctgcaa 120
  ccccttgagg aagcccccag tgttcacccc tgtccacgct ttcattgact ggaattgagg 180
  gacatttggc aacaaactaga tccaagggtc ggtcggcaga gaggaccccc aggtccctcta 240
  aagaataaag acccttctga aagcctaaaa a 271

20 <210> 49
  <211> 418
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

  <220>
  <223> IMX2_60
  <400> 49
  cggctctgtat tctgtgaaac tgggagctctg gctctgggaat tgcagaatt ctgctgaat 60
  ggaataaccac tggggaggaag aggtctgaag aagggatata cgtgggggg tgaatgaatg 120
  atcactctag gacaaaggca ggaattctat gggggaact ttgatgcaa gcaatccctt 180
  gttggggaga catgggagt tcccttggtg gaccatgttg tcccttga aaaggatca 240
  gacagctgta acaatggcaa ccttataaaa tggcaagctc ttaattatga agacaaaggc 300
  tatgtgggga ctaagcccaa actgtgggtt taagctaact gctctatga atataagctc 360
  gcttttggtc tgttaaatg ataattgggca ttgcattaaa aaagcaaaag aataaaaa 418

35 <210> 50
  <211> 352
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

  <220>
  <223> IMX2_1
  <400> 50
  cggaaacggg gaccgctggc ggctgagggt gtgttcacac cgggaattat cattctcact 60
  agtggggaagt gtaggcagtt gtctcaattt tgcctgaatc gccacaggtg agtgcggggc 120
  agcacccctga tgggcccacc agctggagcc tccaaactac accaactcac caccctctgc 180
  ctctctccctc taccccaaga gctcacagag tgatcaacat gaaagaatcc tgaagggaag 240
  aggcacactgg agggagtcag gcttaaggct aatggctctt ccacccctgg gagagaggtc 300
  tccctagggc ctgctgtggc tgttcagata aatccacatg gctctccaaa aa 352

50 <210> 51
  <211> 135
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

  <220>
  <223> IMX2_65
  <400> 51
  cggaaacccc gaaacccaa cgaactaccta aaaaacattt tctgaatcaa ctggtctatg 60
  ttgcaaaata gtgagaagat ttttaggtag aggtgaaaag cctaacagagc ttggtgatag 120
  ctggttacc c aaaaa 135

60 <210> 52

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

Kf

```

<211> 186
<212> DNA
<213> Mus musculus

5  <220>
    <221> IMX2_66
    <400> 52
    cggacggagg attaccctgt ccagaagtgt ggccacaagg aggcagtggt cttccagtca 60
    cacagtgcct gggctgaggc cggcatgcgc cggtaattat tttgcactgc cccacattgc 120
    ggccacggct ggacggagtg atcgttctct cttccacctg taataaatgc cagttctctc 180
    taagaa 186

<210> 53
<211> 216
<212> DNA
<213> Mus musculus

20 <220>
    <221> IMX2_68A
    <400> 53
    cggcctccac ccaacaactt tatcatttct tcaattctga gggtttgcca cgaattgctt 60
    tctccagtct aaccggcttg atctacattt actatltcca ggagagctct cttccagaca 120
    ctctgcctct cctctcaaaa cctctcactt cccagctcgt gcaaaactgg tatcacctag 180
    aaacgcacaa taagagggtg gctttcgggg taaaaa 216

25 <210> 54
    <211> 216
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

30 <220>
    <221> IMX2_68B
    <400> 54
    cggcctcccg cagaggttct aaagaagctg agtgagggtg aagaggaggc agcttcagct 60
    ggaggagccc aggttaacct aatgccagtg acagatgagg tcgtgtgccc ttccagtact 120
    gtcacagact cctgctcgag ttctctgaga gttgtcccc ccccccctagg gtgggtttgc 180
    tcaactgaat aaacatggtt aatagctggc taaaaa 216

40 <210> 55
    <211> 100
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

45 <220>
    <221> IMX2_59
    <400> 55
    cggcctgtgt tgcctgtagg atgggaaact tgcatttct ctctccttat cctctctgta 60
    agacatccat ttaataaagt ctcatgctga gagccaaaa 100

50 <210> 56
    <211> 312
    <212> DNA
    <213> Mus musculus

55 <220>
    <221> IMX2_71
    <400> 56
    cgggcattca tgggttccaa ctgccactgc cccagtcttg gccagagata cccctctgtc 60
    ctgactggaa gctggacatc tgcccactga gctttggtag aaggltccaga ggtttggggg 120
    accctgtgtc ctggggcacc ctgccctggg gtaacctcta ctttggggga cgtttcagca 180
    cccattctct gactcttga agatgcactt gcccgcacag ctgggcagca cggctgtctt 240

```

WO 00/77166

PCT/US00/15973

15

```

ctgcagagac tgcctggctc tcatctgact ttgctggctc aactgaaata agccttctgg 390
gaagcacaata aa 312

5 <210> 57
  <211> 374
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

10 <220>
  <223> IMX2_72
  <400> 57
    cgggctcaac cgcgtgaagg tttcccaggc agctgcagac ttgaacagct tctgtccgca 60
    gaatgctcaa catgacccctc tgcctgactgg agtctcttca agtacgaatc ccttcagacc 120
    ccagaaagtc tgcctccttt tctagctcatc tatcttgagg ttctcacaac cacttttcat 180
    gaaccagtgca atattccagga gaactaattc tgaagtcctgt acaaaagctt cttcttcaaa 240
    cgggcacataa taccatattc tctgctcgtc agtacttaac atctaacctc ctgaattcca 300
    tggatttctg tctcacaagg ttttaactatc ttatataaac tggctgttagc atacaataaa 360
    gcatactcra aaaa 374

20 <210> 58
  <211> 251
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

25 <220>
  <223> IMX2_73
  <400> 58
    cggtaagcat ggcgaagacc gcaagttcac cgcgggttct taccctcgcc tggaaagata 60
    ccgcaaaaggc atctttggag actggtccga cccatctctt gccctctacg gcaagtgcta 120
    ttgatgctct gaggctctgt ctacccaagg tggccttggg aattgctgca gctccaagag 180
    ccaggaggca agatgaaccc agacctgctt ctcatagctt cctctgaata cagcccttcc 240
    aaaggtaaaa a 251

35 <210> 59
  <211> 248
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

40 <220>
  <223> IMX2_1
  <400> 59
    cggaaagcca aggaaggaga tctgtcaetc acagcctteg tctcactcgc actgcaggaa 60
    ctcaagggaca tctgtgaggg gcaagtcact agccttcccg ggaacatcaa caaggcaggg 120
    ggttatattg aagccagtta catgaacctg cagagaccat acacagtggc cattgctggg 180
    tatgctctgg cctctacgna caaaactggg gaaccttacc tgggcaagtt tctgaacaca 240
    gccaaaaa 248

50 <210> 60
  <211> 64
  <212> DNA
  <213> Mus musculus

55 <220>
  <223> IMX2_3
  <400> 60
    cgggacggga gggggccgrr gacacccagc tagggcccaa caaagttata cttacgctga 60
    aaaa 64

```


WO 00/77166

PCT/US00/15973

16

<210> 61
 <211> 121
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <225> IMX2_34
 <400> 61
 10 cgggggtgct aggtctgagg ctttaggact ctggctctct gagctcagct caggggcagg 60
 gcttcgctgg atgaggggct ctgctctaca gggtaaataa aagaaaagct ttttgacagc 120
 c 121
 15
 <210> 62
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <225> IMX2_70
 <400> 62
 25 cgggcatcta atggctcagg gcaggctcat ggcctcgtga gcttcggctc ctctctgggc 60
 tgcactacc ccgcacagcc atccgtcttc accagggctt ccaactacat tgactggatc 120
 aactcggtag cggcaaggaa ctaactgaag acattactgc cactgtcccc ctggaaatgc 180
 catagaaaag aatatgtaat aagctaatta aagaattcac 219
 30
 <210> 63
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 63
 40 gaattcaact ggaaggggc cgcaggaaatt tttttttttt ttttttvmn 49
 <210> 64
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 45 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 64
 50 aggtcgacgg tatcgg 16
 <210> 65
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 55 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 60
 <400> 65
 ggtcgacggc atcggn 16

WG 0077166

PCT/US00/15973

f7

<210> 66
 <211> 15
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 10 <400> 66
 gagctccacc gcggt 15
 <210> 67
 <211> 16
 15 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 20 <400> 67
 cgacgggtatc ggnnnn 16
 <210> 68
 <211> 16
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 30 <400> 68
 cgacgggtatc gcgcgcg 16
 <210> 69
 <211> 30
 35 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 40 <400> 69
 gatcgaatcc ggatacagca gcagctgggc 30
 <210> 70
 <211> 30
 45 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 50 <400> 70
 gatcgaatcc gggctctggg tccactgttc 30
 <210> 71
 <211> 30
 55 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 60

WO 00/77166

PCT/US00/15973

18

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 5 <400> 71 gatcgaatcc gggggcgcca ggtgtgaggc 30
 <210> 72
 <211> 30
 <212> DNA
 10 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 15 <400> 72 gatcgaatcc ggcatggga attcagttatt 30
 <210> 73
 <211> 30
 20 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 25 <400> 72 gatcgaatcc ggtgcctgt atgctctgag 30
 <210> 74
 <211> 30
 30 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 35 <400> 74 gatcgaatcc ggctccctgt atcccaggct 30
 <210> 75
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 45 <400> 75 gatcgaatcc gggggtgcca ggtgtgaggc 30
 <210> 76
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 55 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 <400> 76

WO 00/77166

PCT/US00/15973

19

gatcgaatcc ggataacagc atgtctatgt 30
 <210> 77
 <211> 30
 5 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 10 <400> 77
 gatcgaatcc ggcaaaactc tcaattacca 30
 <210> 78
 15 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 20 <400> 78
 gatcgaatcc ggcggcagc gggaccagac 30
 <210> 79
 25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 79
 35 gatcgaatcc ggtgtctgt ctgtctgtgag 30
 <210> 80
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 80
 45 gatcgaatcc ggaaccccg aaaccaaacg 30
 <210> 81
 <211> 30
 <212> DNA
 50 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 55 <400> 81
 gatcgaatcc ggacggagga ctaccctgc 30
 <210> 82
 60 <211> 30
 <212> DNA

WO 00/77166

PCT/US80/15973

30

<213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 5 <400> 82
 gatcgaatcc ggcggtgtgt gccgtaggag 30
 <210> 83
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 15 <400> 83
 gatcgaatcc gggcatctaa tggcctgtgg 30
 <210> 84
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 25 <400> 84
 gatcgaatcc gggcatccat gggttccaac 30
 <210> 85
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 35 <400> 85
 gatcgaatcc ggacaccata gagacctga 30
 <210> 86
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 50 <400> 86
 gatcgaatcc ggagaccac atcgatctaa 30
 <210> 87
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>

WO 00/77166

PCT/US00/15973

24

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 5 <400> 87
 gatcgaatcc ggcgatagt ggtgtatgcc 30
 <210> 88
 <211> 30
 <212> DNA
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 15 <400> 88
 gatcgaatcc ggtactgggg aggcacaggg 30
 <210> 89
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 25 <400> 89
 gatcgaatcc gggatgtggg saggttagaa 30
 <210> 90
 <211> 30
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 40 <400> 90
 gatcgaatcc ggtagggtag agtctcgcca 30
 <210> 91
 <211> 30
 <212> DNA
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer
 50 <400> 91
 gatcgaatcc ggttcccata tctttgaggg 30
 <210> 92
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic

WO 00/77166

PCT/US00/15973

22

primer

5 <400> 92
 gatcgaatcc ggcgatgtac actcgggtca 30
 <210> 93
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 15 <400> 93
 gatcgaatcc ggcgatgtac tgtgtgaact 30
 <210> 94
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 25 <400> 94
 gatcgaatcc ggcgatgtac tcaagtctgg 30
 <210> 95
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 35 <400> 95
 gatcgaatcc ggtcctggca gacagacatg 30
 <210> 96
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 45 <400> 96
 gatcgaatcc ggtgataaga gcaacttcgc 30
 <210> 97
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 55 <400> 97
 gatcgaatcc ggtgataaga gcaacttcgc 30
 <210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 60 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

WO 00/77166

PCT/US00/15973

23

<400> 97
 gatcgaatcc ggcggccacc caacaacttt 30
 5 <210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 98
 15 gatcgaatcc ggcggccacc agaggccga 30
 <210> 99
 <211> 30
 <212> DNA
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 25 <400> 99
 gatcgaatcc ggtaagcatg gcaagaccgg 30
 <210> 100
 30 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 100
 40 cacagccctc gtcttcacgg cactg 25
 <210> 101
 <211> 25
 <212> DNA
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 50 <400> 101
 ttgttcacga gggccagggc atacc 25
 <210> 102
 55 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 60 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

WO 00/77166

PCT/US00/15973

24

<400> 102
 tctgaagccc cgggtccccc ccaact
 25
 5 <210> 103
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 103
 15 ttacggccccc gctcccatto c
 21
 <210> 104
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 25 <400> 104
 ccaagtcacca ggctgtctg tt
 22
 <210> 105
 <211> 26
 <212> DNA
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 35 <400> 105
 tggctccccc tgtagaaccc ccaaaa
 25
 40 <210> 106
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 106
 50 acatagagct gttggatgat ttga
 25
 <210> 107
 <211> 25
 <212> DNA
 55 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 60 <400> 107

WO 00/77166 25 PCT/US00/15973

caagttcttc gcactgttcc ttgta 25

<210> 108
 <211> 24
 5 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 10 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

<400> 108 24
 cgacctcaag atgtgccact ctga

<210> 109
 <211> 25
 15 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 20 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

<400> 109 25
 25 acaagttctt ctgaggcaca gacgg

<210> 110
 <211> 25
 30 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 35 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

<400> 110 25
 gaacaaagga tccacacccc aaacc

<210> 111
 40 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 45 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

<400> 111 25
 50 gcacatgtgg aggacacggt ctcca

<210> 112
 <211> 25
 55 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer

<400> 112 25
 60 atgaaaaata tggaaaatga taaaa

WO 00/77166

PCT/US00/15973

26

5 <210> 113
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
primer
10 <400> 112
ctaaaatgtt ctacagtgtg gttt 24

15 <210> 114
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
primer

25 <400> 114
gccccagacag aagttatagc cactc 25

30 <210> 115
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
primer
35 <400> 115
tttatggctt ttccgttgag ggaca 25

40 <210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
primer
45 <400> 116
gagtcctggct ctgggattgc agaa 24

50 <210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
primer

60 <400> 117
cccccatagg aatcctgctc ttgt 24

WO 00/77166

PCT/US00/15973

27

<210> 118
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 10
 <400> 118
 ccactgggga ggaaggctt gaa 23
 <210> 119
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 15
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 20
 <400> 119
 ccacacgggc ccacaaggaa acatc 25
 <210> 120
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 120
 35 gcaggcgcat ggcacgtga 30
 <210> 121
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 45
 <400> 121
 ggggacagtg gcagtaatgt cttoa 25
 <210> 122
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 50
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 55
 <400> 122
 taagagatta gcacggtggg acg 23
 60
 <210> 123

WO 00/77166

PCT/US00/15973

28

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 10 <400> 123
 ctggtttgac agagacgcag tagtc 25
 <210> 124
 <211> 30
 <212> DNA
 15 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 20 <400> 124
 gatcgaatcc ggaacggggg accgctggcg 30
 <210> 125
 <211> 30
 <212> DNA
 25 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 30 <400> 125
 gatcgaatcc ggacctcacc gaccagccca 30
 <210> 126
 <211> 30
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 40 <400> 126
 gatcgaatcc ggagtggcaa agacccaac 30
 45 <210> 127
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 50 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic
 primer
 <400> 127
 55 cagtggtggag gaagctcggg aggtg 25
 <210> 128
 <211> 24
 <212> DNA
 60 <213> Artificial Sequence

WO 00/77166

PCT/US00/15973

59

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic primer

5 <400> 128
cacatcgggg gcaggcagac ttcc 24

10 <210> 128
<211> 137
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <220>
<223> Translation of IMX2_4 Extended Sequences, bases 688-947

<400> 129
Gly Trp Gln Gly Ala Pro Asp Pro Arg Gly Leu Gly Gln Leu Ser Gln
1 5 10 15

20 Pro Tyr Met Gly Gly Glu Met Pro Trp Thr Ile Leu Leu Phe Ala Ser
20 25 30

Val Pro Thr Trp Ile Leu Ala Leu Ser Leu Ser Leu Ala Gly Ala Val
35 40 45

25 Leu Phe Ser Gly Leu Val Ala Ile Thr Val Leu Val Arg Lys Ala Lys
50 55 60

30 Ala Lys Asn Leu Gln Lys Gln Arg Glu Arg Glu Ser Cys Trp Ala Gln
65 70 75 80

Ile Asn Phe Thr Asn Thr Asp Met Ser Phe Asp Asn Ser Leu Phe Ala
85 90 95

35 Ile Ser Thr Lys Met Thr Gln Glu Asp Ser Val Ala Thr Leu Asp Ser
100 105 110

Gly Pro Arg Lys Arg Pro Thr Ser Ala Ser Ser Ser Pro Glu Pro Pro
115 120 125

40 Glu Phe Ser Thr Phe Arg Ala Cys Gln
130 135

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

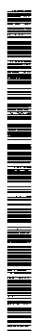
(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 December 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) International Publication Number
WO 00/77166 A3

- (51) International Patent Classification: C07H 21/04. (74) Agent: ZIMMERMAN, Roger, P.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, 32nd Floor, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US00/15973
- (22) International Filing Date: 9 June 2000 (09.06.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/138,487 10 June 1999 (10.06.1999) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): DIGITAL GENE TECHNOLOGIES, INC. [US/US]; 11149 North Torrey Pines Road, Suite 110, La Jolla, CA 92037 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VINEX, Joanne [GB/US]; 5532 Southwest Lander Place, Seattle, WA 98116 (US). SIMS, John, E. [US/US]; 4207 43rd Avenue North East, Seattle, WA 98116 (US). DUBOSE, Robert, F. [US/US]; 6151 156th Place South East, Bellevue, WA 98006 (US). HILBUSH, Brian, S. [US/US]; 13058 Caminito Angelico, San Diego, CA 92130 (US). HASEL, Karl, W. [CH/US]; 247 South Rioño Avenue, Solana Beach, CA 92075 (US). RUCINER, Robert, R. [US/US]; 7164 Park Village Road, San Diego, CA 92129 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GE, GD, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
With international search report.
- (89) Date of publication of the international search report: 17 May 2001
- 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 00/77166 A3

(54) Title: GENE EXPRESSION MODULATED IN GASTROINTESTINAL INFLAMMATION

(57) Abstract: Polynucleotides, polypeptides, kits and methods are provided related to regulated genes characteristic of gastrointestinal inflammation.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/15973
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 21/04; C07K 5/00; C07K 14/00; C07K 16/00; C12Q 1/68 US CL : 536/23.1; 530/300, 350, 387.1; 435/6 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. : 536/23.1; 530/300, 350, 387.1; 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DIALOG, MEDLINE, EAST gene expression, polypeptides/proteins, inflammatory/inflammation, gastrointestinal/intestinal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,733,748 A (YU et al) 31 March 1998, see especially cols 1-30, and 61-64.	1-33
Y	US 5,695,995 A (WEINTRAUB et al) 09 December 1997, see especially cols 2-28, and 57-58.	1-33
Y	WO 98/09985 A2 (EISENBACH-SCHWARTZ et al) 12 March 1998, see especially pages 3-37.	1-33
Y	US 5,641,497 A (BEVINS et al) 24 June 1997, see especially cols 7-22, and 51-52.	1-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "U" earliest document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited in establishing the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 06 DEC 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer SHUBO "JOE" ZHOU Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
// C 1 2 P 21/02	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 P 21/08	

(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,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,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

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886
弁理士 村上 清

(72)発明者 ヴィネイ, ジョアン
アメリカ合衆国ワシントン州9 8 1 1 6, シアトル, サウスウエスト・ランダー・プレイス 5 5
3 2

(72)発明者 シムズ, ジョン・イー
アメリカ合衆国ワシントン州9 8 1 1 6, シアトル, フォーティサード・アベニュー・ノース・イ
ースト 4 2 0 7

(72)発明者 デュボセ, ロバート・エフ
アメリカ合衆国ワシントン州9 8 0 0 6, ベルヴュー, ハンドレッドフィフティシックス・プレ
イス・サウス・イースト 6 1 5 1

(72)発明者 ヒルブッシュ, ブライアン・エス
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 2 1 3 0, サン・ディエゴ, カミnit・アンジェリコ 1 3 0
5 8

(72)発明者 ハゼル, カール・ダブリュー
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 2 0 7 5, ソラナ・ビーチ, サウス・ナード・アベニュー 2
4 7

(72)発明者 ブフナー, ロバート・アール
アメリカ合衆国カリフォルニア州9 2 1 2 9, サン・ディエゴ, パーク・ヴィレッジ・ロード 7
1 6 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 CA09 CA10 EA04 FA18 GA11 HA01 HA12
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ13 QQ42 QQ79 QR32 QR55
QR62 QS12 QS25 QS34

4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA46X AA72X AA88X AA90X AA91X AA91Y AA93X AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA44 CA53 DC50 NA14 ZA661 ZA662
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZA66 ZB11
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA22 EA50 FA72
FA73 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004500028A5	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2001504001	申请日	2000-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	数字基因技术公司		
申请(专利权)人(译)	数字基因技术公司		
[标]发明人	ヱィネイジョアン シムズジョンイー デュボセロバートエフ ヒルブッシュブライアンエス ハゼルカールダブリュー ブフナーロバートアール		
发明人	ヱィネイ,ジョアン シムズ,ジョン・イー デュボセ,ロバート・エフ ヒルブッシュ,ブライアン・エス ハゼル,カール・ダブリュー ブフナー,ロバート・アール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P29/00 C07K14/47 C07K14/52 C07K14/81 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6883 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P29/00 C07K14/522 C07K14/811 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P29/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/02.C C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/EA04 4B024/FA18 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA46X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C084/ZA662 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZB11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 村上 清		
优先权	60/138487 1999-06-10 US		
其他公开文献	JP2004500028A		

摘要(译)

提供了与胃肠道炎症特征的受调节基因相关的多核苷酸，多肽，试剂盒和方法。

