

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508169  
(P2005-508169A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

**C12Q 1/68**  
**A61K 45/00**  
**A61P 35/00**  
**C12N 15/09**  
**C12Q 1/02**

F 1

C 12 Q 1/68  
A 61 K 45/00  
A 61 P 35/00  
C 12 Q 1/02  
C 12 Q 1/48

Z N A A  
A 61 K 45/00  
A 61 P 35/00  
C 12 Q 1/02  
Z

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4  
4 B 0 6 3  
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 166 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-539603 (P2003-539603)	(71) 出願人	500287639 ミレニアム・ファーマシューティカルズ・ インコーポレイテッド M I L L E N N I U M P H A R M A C E U T I C A L S , I N C .
(86) (22) 出願日	平成14年10月29日 (2002.10.29)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月27日 (2004.4.27)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/034574	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02003/037257		
(87) 國際公開日	平成15年5月8日 (2003.5.8)		
(31) 優先権主張番号	60/335,006		
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 20750を使用した細胞増殖障害の診断および処置のための方法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、細胞増殖障害、例えば、癌（結腸癌、乳癌および肺癌を含むが、これらに限定されない）の処置および診断のための方法および組成物に関する。本発明はさらに、細胞増殖障害を処置し得る化合物を同定するための方法を提供する。本発明はまた、細胞増殖障害を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。さらに、本発明は、異常な20750ポリペプチド活性または異常な20750核酸発現によって特徴付けられる細胞増殖障害を有する被験体を処置するための方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞増殖障害を処置し得る化合物を同定するための方法であって、該化合物が 20750 核酸発現または 20750 ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイし、それによって、細胞増殖障害を処置し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。

**【請求項 2】**

細胞増殖を調節し得る化合物を同定するための方法であって、以下：

- a) 20750 を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；および
  - b) 該試験化合物が、20750 核酸の発現または 20750 ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイし、それによって、細胞増殖を調節し得る化合物を同定する工程
- 10

を包含する、方法。

**【請求項 3】**

細胞における細胞増殖を調節するための方法であって、細胞を 20750 調節因子と接触させ、それによって、該細胞中の細胞増殖を調節する工程を包含する、方法。

**【請求項 4】**

前記細胞が、胸部細胞、肺細胞または結腸細胞である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記 20750 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記 20750 調節因子が、20750 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記 20750 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記 20750 調節因子が、20750 核酸発現を調節し得る、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 9】**

異常な 20750 ポリペプチド活性または異常な 20750 核酸発現によって特徴付けられる細胞増殖障害を有する被験体を処置するための方法であって、20750 調節因子を該被験体に投与し、それによって、該細胞増殖障害を有する被験体を処置する工程を包含する、方法。

**【請求項 10】**

前記細胞増殖障害が、乳癌、肺癌および結腸癌からなる群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 20750 調節因子が、薬学的に受容可能な処方物において投与される、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 20750 調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記 20750 調節因子が、20750 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 9 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本出願は、2001年10月31日出願の米国仮特許出願番号 60/335,006 号（この内容全体は、本明細書中に参考として援用される）に対する優先権を主張する。

**【背景技術】**

10

20

30

40

50

**【 0 0 0 2 】**

癌は、米国における心疾患に次ぐ第2の死因である（Boringら（1993）CA Cancer J. Clin. 43: 7）。癌は、増殖して腫瘍塊を形成する、正常組織由来の異常細胞または新生物性細胞の数の増加、これらの新生物性腫瘍細胞による隣接組織の浸潤、ならびに血液系またはリンパ系を介して局所リンパ節および離れた部位へ広がる悪性細胞の生成によって主に特徴付けられる。後者の悪性腫瘍への進行は、転移といわれる。

**【 0 0 0 3 】**

結腸直腸癌は、西部で最も蔓延する癌である。結腸直腸癌の推定 129,400 件の新たな症例が、1999年に米国において生じた（Rudyら（2000）Am Fam Physician 61(6): 1759-70, 1773-4）。70歳までに、西部の集団の少なくとも 50% が、結腸直腸癌のいくつかの形態（早期良性ポリープおよび浸潤性腺癌を含む）を発症する。良性ポリープ状病巣の約 10% が、浸潤癌に進行すると推定される（Fahyら（1998）Surg Oncol 7(3-4): 115-23）。結腸直腸癌は、前駆体病巣、腺癌ポリープ（これは、上皮細胞過剰増殖の領域で形成する）および陰窩形成異常（crypt dysplasia）から生じる。この前駆病巣から結腸直腸癌への進行は、多段階工程である（Winawer（1999）Am J Med 106(1A): 3S-6S）。

**【 0 0 0 4 】**

肺癌は、世界中で最も一般的な癌の形態である。1985年の推定は、世界中で約 900,000 件の肺癌が存在したことを示す（Parkinら（1993）Int J Cancer; 54: 594-606）。米国のみについて、1993年の予測は、170,000 件の新たな肺癌症例数（約 88% の死亡率）を推定した（place）（Boringら、前出）。乳癌の発症は米国においてわずかにより一般的であるが、肺癌は、男性では前立腺癌に次いで 2 番目であり、そして女性では乳癌および直腸結腸癌に次いで 3 番目である。未だに、肺癌は、最も一般的な癌の死因である。

**【 0 0 0 5 】**

世界保健機構は、肺癌を 4 つの主要な組織学的型に分類する：（1）扁平上皮細胞癌（S CC）、（2）腺癌、（3）大細胞癌、および（4）小細胞肺癌（SCLC）。（The World Health Organization, Am J Clin Pathol (1982) 77: 123-136）。しかし、種々のサブタイプ内でさえ多くの腫瘍異質性が存在し、そして肺癌について 1 つより多い形態学的サブタイプの特徴を有することは、まれではない。用語非小細胞肺癌（NSCLC）は、扁平上皮細胞癌、腺癌および大細胞癌を含む。

**【 0 0 0 6 】**

早期検出は、困難である。なぜなら、臨床症状は、しばしば、この疾患が進行段階に達するまで見られないからである。現在、診断は、胸部 X 線の使用、痰中に含まれる細胞型の分析、および気管支通路の光ファイバー実験によって補助される。処置レジメンは、癌の型および段階によって決定され、処置レジメンとしては、手術、放射線治療および／または化学療法が挙げられる。この疾患についての治療に相当な研究がなされているにもかかわらず、肺癌は、処置困難なままである。

**【 0 0 0 7 】**

乳癌（carcinoma または cancer）は、生命の第 3 世代の最初の女性または全般的に老化し続けている女性に対する主要な医療問題である。現在米国において、女性は、生涯（80 歳の年齢まで）で、8 分の 1 の確率でこの疾患を発症すると推定されているが、28人のうち 1 人の女性が、乳癌が原因で死亡する生涯の危険性を有する（Harrisら編、Diseases of the Breast, 1996: pp. 159-168）。胸部の癌腫は、3 番目に一般的な癌であり、女性においては、最も一般的な癌である。これは、女性における死亡率の主要な原因であり、そして障害、心理学的傷害、および経済的損失の原因である。乳癌は、米国において、女性における 2 番目に一般的

な癌死の原因であり、15歳と54歳との間の女性については、癌関連死の主要な原因である(Forbes, Seminars in Oncology, vol. 24 (1), Suppl 1, 1997: pp. S1-S20-S1-S35)。この疾患の間接的な影響はまた、進行性疾患(例えば、骨または脳への転移)の結果を含む、乳癌による死亡率に寄与する。骨髄抑制、放射線纖維症および好中球減少性敗血症から生じる合併症、治療介入(例えば、外科手術、放射線、化学療法、または骨髄移植)からの副作用もまた、この疾患による罹患率または死亡率に寄与する。

#### 【0008】

これらの障害の有病率ならびに有効な治療および早期診断薬の欠如に基づいて、現在、症状の発症前のマーカーとして働き得る方法および組成物、ならびにこれらの障害を処置および治療するための治療薬を同定するための手段をして働き得る方法および組成物に対する多大な必要性が存在する。

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0009】

本発明は、細胞増殖障害(例えば、癌(結腸癌、乳癌、および肺癌が挙げられるがこれらに限定されない))の診断および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、20750分子(プロテインキナーゼファミリーの新規のメンバー)が、正常細胞(例えば、正常結腸細胞、正常肺細胞、および正常胸部細胞)と比較した場合に、腫瘍細胞(例えば、結腸腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、および胸部腫瘍細胞)において差次的に発現され、かつ正常肝臓組織と比較した場合に、肝臓への結腸転移に由来する組織において高度に増大され、従って、細胞増殖傷害(例えば、癌(結腸癌、肺癌および乳癌が挙げられるがこれらに限定されない))の診断および処置において有用であるという発見に、少なくとも一部に基づく。機構によって制限されることを意図しないが、20750分子は、-カテンの安定性に影響を与えることによって、Wntシグナル伝達回路を通して発癌を調節し、それによって、細胞増殖障害(例えば、癌)の処置、予後、または診断のための標的および治療剤として有用であると考えられる。

#### 【0010】

従って、本発明は、細胞増殖障害(例えば、癌(結腸癌、乳癌、および肺癌が挙げられるがこれらに限定されない))の診断および処置のための方法を提供する。

#### 【0011】

1つの局面において、本発明は、細胞増殖障害(例えば、癌(結腸癌、乳癌、および肺癌が挙げられるがこれらに限定されない))を処置することができる化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、化合物が20750核酸発現または20750ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイする工程を包含する。1つの実施形態において、化合物が核酸発現または20750ポリペプチド活性を調節する能力は、細胞増殖(例えば、腫瘍細胞の増殖)の調節を検出することによって決定される。別の実施形態において、化合物が核酸発現または20750ポリペプチド活性を調節する能力は、細胞中の-カーテンの濃度の調節を検出することによって決定される。

#### 【0012】

別の局面において、本発明は、20750活性(例えば、細胞内-カーテン濃度、細胞増殖(proliferation)、細胞増殖(growth)、細胞移動またはWntシグナル伝達経路)を調節することができる化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、20750核酸分子または20750ポリペプチド分子を発現する細胞(例えば、結晶腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、または胸部腫瘍細胞)を、試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物が20750核酸発現または20750ポリペプチド活性を調節する能力を評価する工程、を包含する。

#### 【0013】

本発明の別の局面は、細胞増殖(growth)プロセス、細胞移動プロセス、細胞分化プロセスまたは細胞増殖(proliferation)プロセスを調節するための方法

10

20

30

40

50

を提供する。この方法は、細胞を 20750 モジュレーター（例えば、抗 20750 抗体、配列番号 2 のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを含む 20750 ポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む 20750 ポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、低分子、アンチセンス 20750 核酸分子、配列番号 1 の核酸分子もしくはそのフラグメント、またはリボザイム）と接触させる工程を包含する。

#### 【0014】

なお別の局面において、本発明は、細胞増殖障害（例えば、異常な 20750 ポリペプチド活性または異常な 20750 核酸発現によって特徴付けられる細胞増殖障害）（例えば、癌）を有する被験体を処置するための方法を特徴とする。好ましい実施形態において、細胞増殖障害は、結腸癌、肺癌、または乳癌である。この方法は、治療有効量の 20750 モジュレーターを、例えば、薬学的に受容可能な処方物においてかまたは遺伝子治療ベクターを使用して、被験体に投与する工程を包含する。本発明のこの局面の実施形態は、低分子である 20750 モジュレーター、抗 20750 抗体、配列番号 2 のアミノ酸配列もしくはそのフラグメントを含む 20750 ポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含む 20750 ポリペプチド、配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、アンチセンス 20750 核酸分子、配列番号 1 の核酸分子もしくはそのフラグメント、またはリボザイムを含む。

#### 【0015】

別の局面において、本発明は、被験体に 20750 モジュレーターを投与することによって、この被験体中の細胞増殖を調節する（例えば、増減させる）ための方法を提供する。

#### 【0016】

被験体中の転移を調節する方法または被験体中の腫瘍進行を阻害する方法もまた、特徴とし、この方法は、有効量の 20750 モジュレーター（例えば、20750 インヒビター）を被験体に投与する工程を包含する。

#### 【0017】

本発明は、プロテインキナーゼの新規ファミリーメンバー（本明細書中で「20750」核酸分子および「20750」タンパク質分子をいう）の発見にもまた一部基づく。本発明の 20750 核酸分子または 20750 タンパク質分子は、種々の細胞プロセス（例えば、- カテニン安定性、細胞増殖（proliferation）、細胞増殖（growth）、細胞移動、または Wnt シグナル伝達経路）を調節するための調節因子として有用である。

#### 【0018】

1 つの実施形態において、本発明は、配列番号 1 または配列番号 3 に記載されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を特徴とする。別の実施形態において、本発明は、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子を特徴とする。

#### 【0019】

なお別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 または配列番号 3 に記載されるヌクレオチド配列と実質的に同一（例えば、60 % 同一）であるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を特徴とする。本発明はさらに、配列番号 1 または配列番号 3 に記載されるヌクレオチド配列の少なくとも 68 連続するヌクレオチドを含む単離された核酸分子を特徴とする。別の実施形態において、本発明は、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列と実質的に同一（例えば、60 % 同一）であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子を特徴とする。本発明はまた、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの対立遺伝子改変体をコードする核酸分子を特徴とする。全長ポリペプチドをコードする単離された核酸分子に加えて、本発明はまた、本発明の全長ポリペプチドのフラグメント（例えば、生物学的に活性なフラグメントまたは抗原性フラグメン

10

20

30

40

50

ト) (例えば、配列番号 2 のアミノ酸配列の少なくとも 215 連続するアミノ酸残基を含む、フラグメント) をコードする核酸分子を特徴とする。なお別の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載される単離された核酸分子に相補的であるか、この核酸分子に対してアンチセンスであるか、またはストリンジエントな条件下でこの核酸分子にハイブリダイズする、核酸分子を特徴とする。

#### 【0020】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載される単離された核酸分子(例えば、20750 コード核酸分子)を含むベクターを提供する。このようなベクターは、必要に応じて、異種ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み得る。このようなベクターを含む宿主細胞(例えば、20750 核酸分子および 20750 ポリペプチドを產生するのに適切なベクターを含む宿主細胞)もまた、特徴とする。

#### 【0021】

別の局面において、本発明は、単離された 20750 ポリペプチドおよび / またはその生物学的に活性なフラグメントもしくは抗原性フラグメントを特徴とする。例示的な実施形態は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 60% 同一なアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 1 または配列番号 3 に記載されるヌクレオチド配列と少なくとも 60% 同一なヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるポリペプチドを特徴とする。本明細書中に記載される全長ポリペプチドのフラグメント(例えば、配列番号 2 に示される配列の少なくとも 215 連続するアミノ酸残基を含む、フラグメント)、および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドの対立遺伝子改変体もまた、特徴とする。

#### 【0022】

20750 ポリペプチドおよび / またはその生物学的に活性なフラグメントもしくは抗原性フラグメントは、例えば、20750 媒介障害または 20750 関連障害の処置および / または診断に適用可能なアッセイにおける試薬または標的として有用である。1つの実施形態において、20750 ポリペプチドまたはそのフラグメントは、20750 活性を有する。別の実施形態において、20750 ポリペプチドまたはそのフラグメントは、以下のドメイン(膜貫通ドメイン、プロテインキナーゼドメイン)のうちの少なくとも 1 つを含み、そして必要に応じて、20750 活性を有する。関連する局面において、本発明は、抗体(例えば、本明細書中に記載されるポリペプチドのいずれか 1 つに特異的に結合する抗体)、および融合タンパク質(本明細書中に記載されるポリペプチドの全てまたはフラグメントを含む)を特徴とする。

#### 【0023】

本発明はさらに、20750 ポリペプチドおよび / または 20750 核酸分子を検出するための方法を特徴とし、このような方法は、例えば、本明細書中に記載される、プローブ、プライマーまたは抗体を特徴とする。キット(例えば、20750 ポリペプチドおよび / または 20750 核酸分子の検出用のキット)もまた、特徴とする。関連する局面において、本発明は、本明細書中に記載される 20750 ポリペプチドもしくは 20750 核酸分子に結合する化合物、および / または本明細書中に記載される 20750 ポリペプチドもしくは 20750 核酸分子の活性を調節する化合物を同定するための方法を特徴とする。20750 活性を調節するための方法を、さらに特徴とする。

#### 【0024】

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

#### 【0025】

表 1 は、ヒト正常組織パネルおよび腫瘍組織パネルにおける 20750 cDNA 発現の TaqMan<sup>TM</sup> 分析の結果を示すグラフである(1 = 正常な動脈、2 = 病変した動脈、3 = 正常な静脈、4 = 冠状動脈平滑筋細胞、5 = H U V E C 、6 = 血管腫、7 = 正常な心組織、8 = うつ血性心不全(CHF) 心臓組織、9 = 腎臓組織、10 = 骨格筋、11 = 正常な脂肪、12 = 脾臓組織、13 = 初代骨芽細胞、14 = 分化した破骨細胞、15 = 正常

10

20

30

40

50

な皮膚組織、16 = 正常な脊髄、17 = 正常な脳皮質、18 = 視床下部、19 = 神経組織、20 = 後根神経節(DRG)、21 = 正常な胸部組織、22 = 正常な卵巢組織、23 = 卵巣腫瘍組織、24 = 正常な前立腺組織、25 = 前立腺腫瘍組織、26 = 唾液腺、27 = 正常な結腸組織、28 = 結腸腫瘍組織、29 = 肺正常組織、30 = 肺腫瘍組織、31 = 慢性閉塞性肺疾患(COPD)肺組織、32 = 炎症性腸疾患(IBD)結腸組織、33 = 正常な肝臓組織、34 = 肝臓線維症組織、35 = 正常な脾臓組織、36 = 正常な扁桃組織、37 = リンパ節組織、38 = 小腸組織、39 = マクロファージ、40 = 滑膜、41 = 骨髄、42 = 活性化PBM C、43 = 好中球、44 = 巨核球、45 = 赤血球組織、46 = ポジティブコントロール)。

## 【0026】

10

表2は、異種移植パネル(乳癌細胞株、結腸癌細胞株、肺癌細胞株および乳癌細胞株、ならびに293細胞株および293T細胞株を含む)における20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 = MCF-7胸部腫瘍、2 = ZR75胸部腫瘍、または3 = T47D胸部腫瘍、4 = MDA231胸部腫瘍、5 = MDA435胸部腫瘍、6 = SKBR3胸部腫瘍、7 = DL D-1結腸腫瘍(段階C)、8 = SW480結腸腫瘍(段階B)、9 = SW620結腸腫瘍(段階C)、10 = HCT-116結腸腫瘍、11 = HT-29結腸腫瘍、12 = Colo-205結腸腫瘍、13 = NCI-H125肺腫瘍、14 = NCI-H69肺腫瘍、15 = NCI-H322原発性細気管支癌、16 = NCI-H460肺腫瘍、17 = A549肺腫瘍、18 = 正常ヒト気管上皮(NHBE)、19 = SKOV-3卵巣腫瘍、20 = OVCAR-3卵巣腫瘍、21 = 293乳児腎臓、22 = 293T乳児腎臓)。

## 【0027】

表3は、腫瘍学ヒトパネル(正常腫瘍サンプルおよび固形腫瘍サンプルを含む)における20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 - 3 = 正常な胸部、4 - 8 = 胸部腫瘍、9 = リンパ、10 = 肺(胸部)、11 - 12 = 正常な卵巣、13 - 17 = 卵巣腫瘍、18 - 20 = 正常な肺、21 - 26 = 肺腫瘍、27 - 29 = 正常な結腸、30 - 33 = 結腸腫瘍、34 - 35 = 結腸腫瘍 - 肝臓転移、36 = 正常な肝臓(女性)、37 = 頸部、38 = 頸部 - 扁平上皮、39 = ヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)(停止)、40 = ヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)(増殖)、41 = 血管腫、42 = HCT-116非中毒性、43 = HCT-116低酸素性、44 - 45 = 前立腺、46 = 正常な前立腺腫瘍、47 = 前立腺腫瘍)。

20

## 【0028】

表4は、パネル(正常な結腸サンプル、初期段階の腺癌、結腸から肝臓への転移、および正常な肝臓サンプルを含む)における20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 - 3 = 正常な結腸、4 - 5 = 結腸ACA-C、6 = 結腸ACA-B、7 = 腺癌、8 - 24 = 結腸から肝臓への転移、25 - 27 = 正常な肝臓)。

30

## 【0029】

表5は、結腸ACAパネルにおける20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 - 5 = 正常な結腸サンプル、6 - 7 = 腺腫、8 - 11 = 段階Bの腺癌サンプル、12 - 17 = 段階Cの腺癌サンプル、18 - 22 = 正常な肝臓サンプル、23 - 27 = 結腸から肝臓への転移サンプル、28 = 腹部結腸転移)。

40

## 【0030】

表6は、インビトロで同調された細胞周期パネルにおける20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 = HCT-116、アフィジコリンt=0、2 = HCT-116アフィジコリン、t=3、3 = HCT-116アフィジコリン、t=6、4 = HCT-116アフィジコリン、t=9、5 = HCT-116アフィジコリン、t=12、6 = HCT-116アフィジコリン、t=15、7 = HCT-116アフィジコリン、t=18、8 = HCT-116アフィジコリン、t=21、9 = HCT-116アフィジコリン、t=24、10 = HCT-116ノコダゾール、t=0、11 = HCT-116ノコダゾール、t=3、12 = HCT-116ノコダゾール)。

50

ノコダゾール、t = 6、13 = H C T - 116 ノコダゾール、t = 9、14 = H C T - 116 ノコダゾール、t = 15、15 = H C T - 116 ノコダゾール、t = 18、16 = H C T - 116 ノコダゾール、t = 21、17 = H C T - 116 ノコダゾール、t = 24、18 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 3、19 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 6、20 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 9、21 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 12、22 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 15、23 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 18、24 = D L D - 1 ノコダゾール、t = 21、25 = A 549 ミモシン、t = 0、26 = A 549 ミモシン、t = 3、27 = A 549 ミモシン、t = 6、28 = A 549 ミモシン、t = 9、29 = A 549 ミモシン、t = 15、30 = A 549 ミモシン、t = 18、31 = A 549 ミモシン、t = 21、32 = A 549 ミモシン、t = 24、33 = M C F 10A ミモシン、t = 0、34 = M C F 10A ミモシン、t = 3、35 = M C F 10A ミモシン、t = 6、36 = M C F 10A ミモシン、t = 9、37 = M C F 10A ミモシン、t = 12、38 = M C F 10A ミモシン、t = 18、39 = M C F 10A ミモシン、t = 21、40 = M C F 10A ミモシン、t = 24)。 10

## 【0031】

表7は、インビトロオンコジーン細胞モデルパネル(k-rasを用いてトランスフェクトされた種々の細胞株を含む)における20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析の結果を示すグラフである(1 = Smad4-Sw480コントロール、2 = Smad4-Sw480(24時間)、3 = Smad4-Sw480(48時間)、4 = Smad4-Sw480(72時間)、5 = L51747-ムチン、6 = HT29非ムチン性、7 = SW620非ムチン性、8 = CSC-1正常、9 = NCM-460正常、10 = HCT-116 rer+、11 = SW480 RER+、12 = SW480 rer-/-、13 = CACO rer-/-、14 = JDLD-1、15 = JHCT-116、16 = DKO1、17 = DKO4、18 = DKS-8、19 = Hke3、20 = HKh2、21 = HK2-6、22 = e3Ham#9、23 = APC5-/-、24 = APC6-/-、25 = APC1+/+、26 = APC13+/+)。 20

## 【0032】

表8は、表7に示されるインビトロオンコジーン細胞モデルパネルにおける20750 cDNA発現のTaqMan<sup>TM</sup>分析からの、巨視的な種々のサンプルを示すグラフである(1 = JDLD-1、2 = DKO1、3 = DKO4、4 = DKS-8、5 = JHCT-116、6 = HK2-6、7 = Hke3、8 = HKh2、9 = eHam#9)。 30

## 【0033】

表9は、Smad3-/-マウスモデルにおける20750発現を示すグラフである。(1)12~14週目および(2)18~24週目において、正常な結腸サンプルにおける発現を調査し、(3)12~14週目および(4)18~24週目において、腺腫サンプルにおける発現を調査した。

## 【0034】

表10は、種々の時点(1 = t = 0時間、2 = t = 3時間、3 = t = 6時間、4 = t = 9時間、5 = t = 15時間、6 = t = 18時間、7 = t = 21時間、8 = t = 24時間)においてノコダゾールで処置した、細胞周期調節HCT-116ヒト結腸癌細胞における20750発現を示すグラフである。 40

## 【0035】

(表1)

## 【0036】

【表1】

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	正常な動脈	20.0535
2	病変した動脈	7.239
3	正常な静脈	9.8204
4	冠状 SMC	62.5
5	HUVEC	231.647
6	血管腫	20.4749
7	正常な心臓	39.83
8	心臓 CHF	23.8476
9	腎臓	19.1038
10	骨格筋	42.9857
11	正常な脂肪	10.9343
12	脛膜	27.6802
13	初代骨芽細胞	25.9162
14	破骨細胞(分化)	3.9471
15	正常な皮膚	32.2401
16	正常な脊髄	14.5786
17	正常な脳皮質	177.3904
18	正常な脳視床下部	70.0729
19	神経	15.4634
20	DRG(後根神経節)	33.4929
21	正常な胸部	19.6408
22	正常な卵巢	14.6293
23	卵巣腫瘍	11.3592
24	正常な前立腺	16.8046
25	前立腺腫瘍	29.1573
26	唾液腺	9.3553
27	正常な結腸	6.6382
28	結腸腫瘍	16.8629
29	正常な肺	8.7591
30	肺腫瘍	29.7699
31	肺 COPD	6.1084
32	結腸 IBD	1.4347
33	正常な肝臓	4.996
34	肝臓線維症	19.1701
35	正常な脾臓	6.1722

10

20

30

40

36	正常な扁桃	8.9742
37	正常なリンパ節	12.0904
38	正常な小腸	4.0022
39	マクロファージ	2.5329
40	滑膜	1.835
41	BM-MNC	5.4294
42	活性化 PBMC	2.6588
43	好中球	3.4962
44	巨核球	20.0535
45	赤血球	25.3829
46	ポジティブコントロール	108.8188

10

20

(表2)

【0037】

【表2】

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	MCF-7 胸部 T	61.0
2	ZR75 胸部 T	290.2
3	T47D 胸部 T	55.0
4	MDA 231 胸部 T	45.6
5	MDA 435 胸部 T	20.2
6	SKBr3 胸部	67.7
7	DLD 1 結腸 T (段階 C)	258.8
8	SW480 結腸 T (段階 B)	44.2
9	SW620 結腸 T (段階 C)	45.3
10	HCT116	119.1
11	HT29	21.3
12	Colo 205	7.8
13	NCIH125	244.9
14	NCIH67	143.6
15	NCIH322	119.9
16	NCIH460	116.2
17	A549	113.4
18	NHBE	288.2
19	SKOV-3 卵巣	58.1
20	OVCAR-3 卵巣	75.9
21	293 乳児腎臓	390.9
22	293T 乳児腎臓	277.4

10

20

30

40

【0038】

【表3】

表 3:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	PIT 400 胸部 N	1.95
2	PIT 372 胸部 N	3.33
3	CHT 1228 胸部 N	19.92
4	MDA 304 胸部 T: MD-IDC	9.49
5	CHT 2002 胸部 T: IDC	20.69
6	MDA 236-胸部 T:PD-IDC(ILC?)	5.45
7	CHT 562 胸部 T: IDC	10.27
8	NDR 138 胸部 T ILC (LG)	31.91
9	CHT 1841 リンパ節 ( 胸部 met)	25.38
10	PIT 58 肺 ( 胸部 met)	11.28
11	CHT 620 卵巣 N	27.39
12	CHT 619 卵巣 N	61.21
13	CLN 012 卵巣 T	22.17
14	CLN 07 卵巣 T	4.76
15	CLN 17 卵巣 T	14.48
16	MDA 25 卵巣 T	12.96
17	CLN 08 卵巣 T	5.10
18	PIT 298 肺 N	7.95
19	MDA 185 肺 N	1.65
20	CLN 930 肺 N	4.06
21	MPI 215 肺 T-SmC	37.68
22	MDA 259 肺 T-PDNSCCL	43.59
23	CHT 832 肺 T-PDNSCCL	14.99
24	MDA 262 肺 T-SCC	37.16
25	CHT 793 肺 T-ACA	25.65
26	CHT 331 肺 T-ACA	33.49
27	CHT 405 結腸 N	1.63
28	CHT 1685 結腸 N	13.65
29	CHT 371 結腸 N	2.14
30	CHT 382 結腸 T: MD	2.70
31	CHT 528 結腸 T: MD	6.90
32	CLN 609 結腸 T	13.37
33	NDR 210 結腸 T: MD-PD	8.58
34	CHT 340 結腸 - 肝臓 Met	20.98
35	CHT 1637 結腸 - 肝臓 Met	14.58

10

20

30

40

36	PIT 260 肝臓 N(雌性 )	2.66
37	CHT 1653 顆鱗状 CC	43.28
38	CHT 569 顆鱗状 CC	7.63
39	A24 HMVEC-Arr	83.33
40	C48 HMVEC-Prol	60.58
41	プールされた血管腫	5.60
42	HCT116N22 酸素正常状態	241.48
43	HCT116H22 低酸素症	190.78
44	CHT 31 前立腺 N	27.11
45	CHT 33 前立腺 N	15.46
46	CHT 1269 前立腺 T: St 5	37.42
47	PIT 120 前立腺 T: St 7	43.28

10

表 4:

組織型	相対的発現
CHT 371 結腸 N	1.04
CHT 523 結腸 N	9.62
NDR 104 結腸 N	11.72
CHT 520 結腸性 ACA-C	7.21
CHT 1365 結腸性 ACA-C	11.01
CHT 382 結腸性 ACA-B	8.70
CHT 122 腺癌	16.98
CHT 077 肝臓-結腸 Mets	11.88
CHT 739 肝臓-結腸 Mets	12.26
CHT 755 肝臓-結腸 Mets	21.94
CHT001 肝臓-結腸 Mets	11.64
CHT 084 肝臓-結腸 Mets	25.38
CHT 113 肝臓-結腸 Mets	4.73
CHT 114 肝臓-結腸 Mets	25.38
CHT 127 肝臓-結腸 Mets	29.36
CHT 137 肝臓-結腸 Mets	22.80
CHT 218 肝臓-結腸 Mets	14.89
CHT 220 肝臓-結腸 Mets	15.04
CHT 324 肝臓-結腸 Mets	14.03
CHT 340 肝臓-結腸 Met	17.28
CHT 530 肝臓-結腸 Met	13.56
CHT 849 肝臓-結腸 Met	10.78

20

30

40

CHT 1637 肝臓-結腸 Met	12.01
CHT131 肝臓-結腸 Met	15.04
NDR 165 肝臓 正常	7.52
NDR 150 肝臓 正常	6.39
PIT 236 肝臓 正常	3.25

表 5:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	CHT 410 結腸 N	1.51
2	CHT 425 結腸 N	5.74
3	CHT 371 結腸 N	1.03
4	PIT 281 結腸 N	45.44
5	NDR 211 結腸 N	4.73
6	CHT 122 線腫	17.10
7	CHT 887 線腫	33.38
8	CHT 414 結腸性 ACA-B	16.92
9	CHT 841 結腸性 ACA-B	20.62
10	CHT 890 結腸性 ACA-B	4.20
11	CHT 377 結腸性 ACA-B	5.35
12	CHT 520 結腸性 ACA-C	4.74
13	CHT 596 結腸性 ACA-C	1.16
14	CHT 907 結腸性 ACA-C	6.02
15	CHT 372 結腸性 ACA-C	9.99
16	NDR 210 結腸性 ACA-C	5.98
17	CHT 1365 結腸性 ACA-C	5.35
18	CLN 740 肝臓 N	7.81
19	CLN 741 肝臓 N	13.79
20	NDR 165 肝臓 N	6.48
21	NDR 150 肝臓 N	10.34
22	CHT 1878 肝臓 N	9.79
23	CHT 119 Col 肝臓 Met	26.10
24	CHT 131 Col 肝臓 Met	13.79
25	CHT 218 Col 肝臓 Met	14.38
26	CHT 739 Col 肝臓 Met	11.84
27	CHT 755 Col 肝臓 Met	10.78
28	CHT 215 Col 腹部 Met	1.12

10

20

30

40

表 6:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	HCT 116 Aphidi t=0	76
2	HCT 116 Aphidi t=3	86
3	HCT 116 Aphidi t=6	62
4	HCT 116 Aphidi t=9	126
5	HCT 116 Aphidi t=12	83
6	HCT 116 Aphidi t=15	80
7	HCT 116 Aphidi t=18	74
8	HCT 116 Aphidi t=21	92
9	HCT 116 Aphidi t=24	81
10	HCT 116 Noc t=0	149
11	HCT 116 Noc t=3	133
12	HCT 116 Noc t=6	130
13	HCT 116 Noc t=9	68
14	HCT 116 Noc t=15	113
15	HCT 116 Noc t=18	114
16	HCT 116 Noc t=21	153
17	HCT 116 Noc t=24	214
18	DLD noc t=3	180
19	DLD noc t=6	171
20	DLD noc t=9	212
21	DLD noc t=12	239
22	DLD noc t=15	374
23	DLD noc t=18	360
24	DLD noc t=21	151
25	A549 Mimo t=0	93
26	A549 Mimo t=3	108
27	A549 Mimo t=6	125
28	A549 Mimo t=9	147
29	A549 Mimo t=15	76
30	A549 Mimo t=18	68
31	A549 Mimo t=21	73
32	A549 Mimo t=24	68
33	MCF10A Mimo t=0	135
34	MCF10A Mimo t=3	186
35	MCF10A Mimo t=6	113
36	MCF10A Mimo t=9	84

10

20

30

40

37	MCF10A Mimo t=12	94
38	MCF10A Mimo t=18	108
39	MCF10A Mimo t=21	128
40	MCF10A Mimo t=24	110

表 7:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	SMAD4-SW480 C	33.61
2	SMAD4-SW480 24HR	42.25
3	SMAD4-SW480 48HR	54.22
4	SMAD4-SW480 72HR	35.16
5	L51747-MUCINOUS	51.83
6	HT29 NON-MUCINOUS	45.75
7	SW620 NON-MUCINOUS	34.67
8	CSC-1 NORMAL	57.91
9	NCM-460 NORMAL	61.64
10	HCT116 RER+	76.68
11	SW48 RER+	303.55
12	SW480 RER-/-	54.22
13	CACO- RER-/-	48.03
14	JDLD-1	227.67
15	JHCT116	123.28
16	DKO1	197.51
17	DKO4	321.97
18	DKS-8	275.48
19	HKe3	96.72
20	HKh2	79.66
21	HK2-6	175.56
22	e3Ham#9	73.05
23	APC5 -/-	0.00
24	APC6-/-	2.00
25	APC1+/+	0.31
26	APC13+/+	0.61

10

20

30

40

表 8:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	JDLD-1	227.67
2	DKO1	197.51
3	DKO4	321.97
4	DKS-8	275.48
5	JHCT116	123.28
6	HK2-6	175.56
7	HKe3	96.72
8	HKh2	79.66
9	e3Ham#9	73.05

表 9:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	正常結腸 12-14 週	3
2	正常結腸 18-24 週	2.9
3	線腫 12-14 週	5.9
4	線腫 18-24 週	5.4

表 10:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	HCT 116 Noc t=0	149
2	HCT 116 Noc t=3	133
3	HCT 116 Noc t=6	130
4	HCT 116 Noc t=9	68
6	HCT 116 Noc t=15	113
7	HCT 116 Noc t=18	114
8	HCT 116 Noc t=21	153
9	HCT 116 Noc t=24	214

本発明は、細胞増殖性障害（例えば、癌（結腸癌、乳癌、および肺癌を含むがこれらに限定されない））の診断および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、プロテインキナーゼファミリー分子の新規メンバー（本明細書中で「20750」といわれる）が、正常細胞に比べて、腫瘍細胞（例えば、結腸腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、および胸部腫瘍細胞）および肝臓へと転移した結腸細胞中で差別的に発現されるという発見に少なくとも一部基づく。20750発現はまた、Smad3<sup>-/-</sup>マウスモデルにおける結腸腫瘍において、そしてHCT-116ヒト結腸腺癌細胞株のG2/M期においてアップレギュレートされ、発癌および細胞増殖における20750についての役割を示す。Smad3<sup>-/-</sup>マウスは、有用であり、これは、ヒト結腸直腸癌についての独自のモデルである。Smad3<sup>-/-</sup>マウスは、組織病理学的にヒト疾患に類似する、結腸癌腫を発症する。疾患進行のいくつかの段階由来のサンプルは、単離され得、この段階としては、正常上皮、増殖性上皮、腺腫様ポリープ、および種々の程度の原発性癌腫およびリンパ節転移が掌

げられる。

【0039】

20750分子は、プロテインキナーゼファミリーのメンバーであり、MAP / 微小管親和性調節キナーゼ様1(MARKL1) (GenBank登録番号AB049127)に相同である。MARKL1は、ヒト肝癌細胞株HepG2を使用する過剰発現実験において、-カテニンによって調節されることが示された(Katohら、(2001)Neoplasia 3(1):4-9)。MARKL1の発現レベルは、肝細胞癌腫の90%において顕著に増加されることが後に示された。-カテニンは、Wntシグナル伝達経路において機能する(Millerら、(1999)Oncogene 18(55):7860-72およびPeifer(1997)Science 275:1752-1753に記載される)。分泌された成長因子のWntファミリーによるシグナル伝達は、細胞運命の決定、細胞増殖、細胞移動、および細胞極性を制御する、発生に重要な主要なシグナル伝達経路の1つを示す。例えば、リン酸化による、-カテニン分解の減少および細胞中の-カテニン濃度の増加が存在する場合、Wntシグナル伝達は、増大し、細胞増殖および細胞移動の増大、細胞極性の変化、ならびに細胞運命の決定の変化を導く。Wnt経路の不適切な活性化は、種々のヒトの癌(最も顕著には、結腸癌)に関与する。機構による限定は意図しないが、-カテニン分解を調節することによって、20750分子が、Wntシグナル伝達経路を調節し、従って、細胞増殖(growth)、細胞増殖(proliferation)、および腫瘍形成を調節すると考えられる。

【0040】

例えば、20750の調節(例えば、阻害)は、-カテニンのリン酸化を低下することによって、-カテニンの安定性を調節(例えば、低下)し得る。細胞における-カテニン濃度の減少は、Wntシグナル伝達の減少を導き、それによって、細胞の増殖(growth)および増殖(proliferation)の低下を導く。従って、本発明の20750分子は、新規診断標的および細胞性増殖障害(例えば、癌)の処置、診断および予後のための治療剤を提供する。好ましい実施形態において、本発明の20759分子は、新規診断標的ならびに結腸癌、肺癌、および乳癌の処置、診断および予後のための治療剤を提供する。

【0041】

本明細書中で使用される場合、「細胞増殖性障害」としては、細胞増殖(growth)、分化、または増殖(proliferation)プロセスに影響を及ぼす疾患または障害が挙げられる。本明細書中で使用される場合、「細胞増殖(growth)プロセス、細胞分化プロセス、または細胞増殖(proliferation)プロセス」は、それにより、細胞の数、サイズもしくは容積が増加するか、細胞が、他の細胞の特徴と異なる特殊化された一組の特徴を発現するか、または細胞が、特定の場所もしくは刺激の近くもしくは遠くへと移動する、プロセスである。細胞増殖(growth)プロセス、細胞分化プロセス、または細胞増殖(proliferation)プロセスとしては、アミノ酸輸送およびアミノ酸分解ならびに細胞の他の代謝プロセスが挙げられる。細胞増殖性障害は、異常に調節された細胞増殖(growth)、細胞増殖(proliferation)、細胞分化、または細胞移動によって特徴付けられ得る。細胞増殖性障害は、腫瘍形成疾患または腫瘍形成障害を含む。本明細書中で使用される場合、「腫瘍形成疾患または腫瘍形成障害」は、腫瘍の発生または腫瘍を発生する傾向を生じ得る、異常に調節された細胞の増殖(growth)、増殖(proliferation)、分化、接着または移動によって特徴付けられる疾患または障害を含む。本明細書中で使用される場合、「腫瘍」は、正常な良性組織塊または悪性組織塊を含む。細胞増殖性(growth)障害または細胞増殖性(proliferation)障害の例としては、癌(例えば、癌腫、肉腫、または白血病)が挙げられるがこれらに限定されず、この例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:結腸癌、卵巣癌、肺癌、乳癌、子宮内膜癌、子宮癌、肝癌、胃腸の癌、前立腺癌、および脳の癌;腫瘍形成および転移;骨格形成異常;ならびに造血性障害および/または骨髄増殖性障害。

10

20

30

40

50

## 【0042】

「示差的発現」は、本明細書中で使用される場合、遺伝子の時間的発現パターンおよび／または組織発現パターンにおける定量的相違および定性的相違の両方を包含する。従って、示差的に発現される遺伝子は、その発現が、細胞増殖(growth)性疾患状態または細胞増殖(proliferation)性疾患状態に対して、正常な状態において活性化または不活性化されているかもしれない。発現が、細胞増殖(growth)性疾患状態または細胞増殖(proliferation)性疾患状態に対して正常な状態において異なる程度あるいは実験状態に対してコントロール状態において異なる程度は、標準的な特徴付け技術(例えば、定量的PCR、ノーザン分析、Taqman<sup>TM</sup>分析、転写プロファイリング、またはサブトラクティブハイブリダイゼーション)を介して可視化されるのに充分に大きいことのみを必要とする。示差的に発現される遺伝子の発現パターンは、細胞増殖性障害評価の予後判定もしくは診断の一部として用いられ得るか、または細胞増殖性障害の処置に有用な化合物を同定するための方法において用いられ得る。さらに、細胞増殖障害に関する示差的に発現される遺伝子は、標的遺伝子発現のレベルまたは標的遺伝子産物の活性の調節が、細胞増殖障害状態を回復するように作用するように、標的遺伝子を提示し得る。標的遺伝子の発現または標的遺伝子産物の活性を調節する化合物は、細胞増殖性障害の処置において用いられ得る。本明細書中に記載される20750遺伝子は、細胞増殖性障害に関して示差的に発現され得、そして／またはそれらの産物は、細胞増殖性障害に対して重要な遺伝子産物と相互作用し得るが、これらの遺伝子はまた、さらなる疾患細胞プロセスに重要な機構に関与し得る。

10

20

30

40

50

## 【0043】

本明細書中で交換可能に使用される場合、「20750活性」、「20750の生物学的活性」、または「20750の機能的活性」は、標準的な技術に従って、インビボもしくはインビトロで決定されるように、20750の応答性細胞もしくは組織(例えば、腫瘍細胞)または20750タンパク質基質に対して、20750タンパク質、20750ポリペプチドまたは20750核酸分子により及ぼされる活性を含む。20750活性は、直接的活性(例えば、20750標的分子との結合)であり得る。本明細書中で使用される場合、「基質」または「標的分子」または「結合パートナー」は、天然で20750タンパク質が結合または相互作用し、その結果、20750媒介機能(例えば、-カテニン分解またはWntシグナル伝達の調節)が達成される、分子である。20750標的分子は、非20750分子、または20750タンパク質もしくは20750ポリペプチドであり得る。このような標的分子の例としては、20750タンパク質と同じシグナル伝達経路にあるタンパク質(例えば、細胞増殖または細胞分化の調節を含む経路において20750タンパク質の上流で機能し得るタンパク質(活性の刺激因子およびインヒビターの両方を含む)または下流で機能し得るタンパク質)が挙げられる。あるいは、20750活性は、20750タンパク質と20750標的分子との間の相互作用により媒介される細胞シグナル伝達活性のような、間接的な活性である。20750の生物学的活性は、本明細書中に記載される。例えば、20750タンパク質は、以下の活性の1つ以上を有し得る：(1) 例えば、Lodish H. ら、Molecular Cell Biology, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995) およびStryer L., Biochemistry, (W.H. Freeman, New York)(これらの内容は、本明細書中に参考として援用される)に記載されるような、20750標的分子(例えば、キナーゼ分子)のリン酸化状態あるいは細胞増殖、細胞代謝または細胞分化(例えば、腫瘍細胞の増殖または分化)に関する1つ以上のタンパク質のリン酸化状態の調節；(2) 細胞増殖または細胞分化(例えば、腫瘍細胞の増殖または分化)に関する1つ以上のタンパク質の活性の調節；(3) 1つ以上の遺伝子(例えば、転写因子)の発現の調節；ならびに(4) シグナル伝達の調節。他の好ましい実施形態において、本発明の20750ポリペプチドは、以下の活性の1つ以上を有する：(1) 癌または腫瘍の進行の調節；(2) 細胞増殖の調節、(4) 細胞分化の調節、(5) 細胞移動の調節、(6) アポトーシスの調節、

(7) 細胞極性の調節、(8) - カテニン安定性(例えば、細胞における分解または蓄積)の調節、および(9) Wntシグナル伝達経路の調節。

【0044】

本発明の種々の局面は、以下の小節にさらに詳細に記載される。

【0045】

(I.スクリーニングアッセイ)

本発明は、20750タンパク質に結合するか、20750発現もしくは20750活性に対して刺激性もしくは阻害性の効果を有するか、または20750標的分子の発現もしくは活性に対して刺激性もしくは阻害性の効果を有する調節因子(すなわち、候補化合物もしくは試験化合物もしくは候補因子もしくは試験因子(例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子、リボザイム、または20750アンチセンス分子))を同定するための方法(本明細書中において「スクリーニングアッセイ」ともいう)を提供する。本明細書中に記載されるアッセイを使用して同定される化合物は、細胞増殖障害を処置するのに有用であり得る。

【0046】

候補/試験化合物としては、例えば、以下が挙げられる：1)可溶性ペプチドのようなペプチド(Igテールの(tailed)融合ペプチドおよびランダムペプチドライブラリーのメンバー(例えば、Lam, K. S.ら(1991)Nature 354:82-84; Houghten, R.ら(1991)Nature 354:84-86を参照のこと)ならびにD配置および/またはL配置のアミノ酸から構成される、コンビナトリアル化学誘導分子ライブラリーを含む)；2)ホスホペプチド(例えば、ランダムで、部分的に縮重した指向性ホスホペプチドライブラリーのメンバー(例えば、Songyang, Z.ら(1993)Cell 72:767-778を参照のこと))；3)抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、および単鎖抗体ならびにFab、Fab'、Fab発現ライブラリーフラグメント、および抗体のエピトープ結合フラグメント)；ならびに4)有機低分子および無機低分子(例えば、コンビナトリアルライブラリーおよび天然産物ライブラリーから得られる分子)。

【0047】

本発明の試験化合物は、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の任意のアプローチを使用して得られ得る。これらのライブラリー法としては、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間アドレス可能な平行固相ライブラリーまたは溶液相ライブラリー；デコンボルーションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。この生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限られるが、その他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam, K. S. (1997)Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0048】

分子ライブラリーの合成方法の例は、当該分野において見出され得、例えば、以下に見出され得る：DeWittら(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 90:6909; Erbら(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 91:11422; Zuckermannら(1994)J.Med.Chem.37:2678; Choら(1993)Science 261:1303; Carrelら(1994)Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 33:2059; Carellら(1994)Angew.Chem.Int.Ed. Engl. 33:2061; およびGallopら(1994)J.Med.Chem. 37:1233。

【0049】

化合物のライブラリーは、溶液中(例えば、Houghten(1992)Biotechniques 13:412-421)、またはビーズ上(Lam(1991)Nat 50

ure 354 : 82 - 84)、チップ上(Fodor(1993)Nature 364: 555 - 556)、細菌上(Ladner USP 5, 223, 409)、胞子上(Ladner USP' 409)、プラスミド上(Cullara(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865 - 1869)もしくはファージ上(Scott および Smith(1990)Science 249: 386 - 390; Devlin(1990)Science 249: 404 - 406; Cwirka(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378 - 6382; Felici(1991)J. Mol. Biol. 222: 301 - 310; Ladner 前出)に示され得る。

## 【0050】

10

20750活性を調節する化合物を同定するために使用され得るアッセイは、20750が標的分子をリン酸化する能力を決定するアッセイを含む。20750活性は、例えば、インビトロキナーゼアッセイを使用することによって決定され得る。簡潔には、キナーゼ標的分子(例えば、-カテニン)は、キナーゼタンパク質および放射性ATP(例えば、 $[{}^3{}^2\text{P}]$ ATP)と共に、MgCl<sub>2</sub>およびMnCl<sub>2</sub>(例えば、10mM MgCl<sub>2</sub>および5mM MnCl<sub>2</sub>)を含有する緩衝液中でインキュベートされ得る。インキュベーションの後、免疫沈降されたキナーゼ標的分子は、還元条件下で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離され、膜(例えば、PVDF膜)に転写され、そしてオートラジオグラフにかけられる。オートラジオグラフの際の検出可能なバンドの出現は、キナーゼ基質がリン酸化されたことを示す。リン酸化された基質のリン酸化アミノ酸分析はまた、キナーゼ基質においてどの残基がリン酸化されたかを決定するために実施され得る。簡単には、放射性リン酸化されたタンパク質のバンドは、SDSゲルから切り出され得、部分的酸加水分解に供され得る。次いで、生成物は、1次元電気泳動において分離され得、例えば、リン酸画像化機(phosphoimager)で分析され得、そしてニンヒドリン染色リン酸化アミノ酸標準と比較され得る。-カテニン安定性の調節は、例えば、Moonら(2001)Gynecol Oncol. 81(3)355 - 9に記載される方法によって、-カテニンのリン酸化についてアッセイすることによって決定され得る。Wntシグナル伝達経路の調節は、例えば、Wongら、(2001)Cancer 92(1): 136 - 145に記載されるように、細胞中の-カテニン濃度についてアッセイすることによって、決定され得る。20750活性を調節する化合物を同定するために使用され得る他のアッセイとしては、以下を決定するためのアッセイが挙げられる:

20

(1) 細胞の増殖または分化(例えば、腫瘍細胞の増殖または分化)に関する1つ以上のタンパク質の活性の調節；(2) 1つ以上の遺伝子(例えば、転写因子)の発現の調節、(3) シグナル伝達の調節、(4) 癌または腫瘍の進行の調節、(5) 細胞増殖の調節、(6) 細胞分化の調節、(7) 細胞移動の調節、(8) アポトーシスの調節、および(9) 細胞極性の調節。

30

## 【0051】

40

20750活性を調節する化合物を同定するために使用され得る細胞増殖アッセイとしては、以下のようなアッセイが挙げられる: Connollyら(1986)Anal. Biochem. 152, 136 - 140に記載されるような細胞数についての酸性ホスファターゼアッセイおよび Loveland, B. E. ら(1992)Biochem. Int., 27: 501 - 510に記載されるようなMTTアッセイ(これは、生存可能な細胞を定量化するために比色アッセイを利用する)(例えば、ミトコンドリアのスクシネートデヒドロゲナーゼによる、テトラゾリウム塩(MTT)のホルマザンへの細胞性還元)。細胞増殖についての他のアッセイとしては、以下が挙げられる: クローン原性アッセイ、<sup>3</sup>Hチミジン取りこみアッセイ、DNAへの放射性標識ヌクレオチドの取りこみを測定するアッセイ、または細胞性増殖を測定するための当該分野で公知の他のアッセイ。さらに、インビボ(例えば、癌を有する患者において)での細胞性増殖の阻害は、腫瘍を検出するための任意の標準的な方法(例えば、腫瘍サイズの×線または画像化分析、あるいは

50

は変異 p 53 タンパク質生産の減少の観察、または生検もしくは組織サンプル内の任意の公知の細胞特異的マーカーまたは腫瘍マーカーの生産の減少の観察)によって検出され得る。20750活性を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば、細胞周期を経る細胞進行をモニタリングすることによって達成され得る。例えば、この細胞は、腫瘍細胞(例えば、結腸腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または胸部腫瘍細胞)であり得る。

#### 【0052】

1つの局面において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、このアッセイにおいて、20750タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞は、試験化合物と接触されて、そしてその試験化合物の20750活性の調節能力が決定される。好ましい実施形態において、20750タンパク質の生物学的に活性な部分は、アミノ酸輸送または分解、細胞代謝あるいは細胞増殖または細胞分化を調節し得るドメインまたはモチーフを含む。試験化合物が20750活性を調節する能力を決定することは、以下により達成され得る: 例えば、20750を発現する細胞における1つ以上の特定の代謝物の產生をモニタリングすること(例えば、Saadaら、(2000) Biochem Biophys. Res. Commun. 269: 382-386を参照のこと)、あるいは細胞代謝、細胞増殖(growth)、細胞増殖(proliferation)、または細胞分化をモニタリングすること。細胞は、例えば、哺乳動物起源(例えば、腫瘍細胞(例えば、肺腫瘍細胞、胸部腫瘍細胞、または結腸腫瘍細胞)であり得る。

#### 【0053】

基質に対する20750の結合を調節するか、または20750に結合する試験化合物の能力もまた決定され得る。基質に対する20750の結合を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば以下により達成され得る: 20750基質の20750への結合が、複合体中の標識された20750基質を検出することにより決定され得るように、放射性同位体または酵素標識と20750基質とをカップリングすること。あるいは、20750を放射性同位体または酵素標識とカップリングして、複合体中の20750基質に対する20750の結合を調節する試験化合物の能力をモニタリングし得る。20750を結合する試験化合物の能力を決定することは、例えば、以下により達成され得る: 20750に対するこの化合物の結合が、複合体中の標識された20750化合物を検出することにより決定され得るように、放射性同位体または酵素標識とこの化合物とをカップリングすること。例えば、20750基質は、<sup>125</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、または<sup>3</sup>Hで、直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてこの放射性同位体は、放射線の直接的計数またはシンチレーション計数により検出される。あるいは、化合物は、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識は、適切な基質の産物への変換の決定により検出される。

#### 【0054】

相互作用するもののいずれも標識することなく、20750と相互作用する化合物の能力を決定することもまた、本発明の範囲内である。例えば、微視的生理機能測定器(microphysiometer)を使用して、化合物または20750のいずれも標識することなく、化合物の20750との相互作用を検出し得る(McConnel, H. M. ら(1992) Science 257: 1906-1912)。本明細書中で使用される場合、「微視的生理機能測定器」(例えば、細胞センサー(cytosensor))は、光アドレス可能な電位差計センサー(LAPS)を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物と20750との間の相互作用の指標として使用し得る。

#### 【0055】

20750活性を調節(例えば、阻害または増大)する20750調節因子の能力はまた、アミノ酸の輸送または分解、細胞代謝、細胞増殖、あるいは細胞分化を上昇または低下のいずれかをする調節因子を同定するスクリーニングアッセイによって決定され得る。1つの実施形態において、本発明は、20750タンパク質または20750ポリペプチド

10

20

30

40

50

を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程、および細胞増殖について細胞を試験する工程、を包含するスクリーニングアッセイを提供する。例えば、20750タンパク質または20750ポリペプチドを発現する細胞は、試験化合物と接触され、続いて、例えば、L o v e l a n d , B . E . ら、(1992) B i o c h e m . I n t . , 27 : 50 1 - 510に記載されるように細胞性増殖を決定するためにか、または、放射性標識されたヌクレオチドのiD N Aへの取り込みを測定することによってか、またはコントロール細胞に比べて存在する細胞の数を測定することによって、定量化される。細胞の数は、例えば乾燥 / 湿潤重量測定によってか、計数チャンバーを使用する、光学密度による細胞の計数によってか、または本明細書中に記載されるような細胞増殖についての他のアッセイもしくは当該分野で公知である細胞増殖についての他のアッセイを使用して、測定され得る。

#### 【0056】

20750発現は、腫瘍（転移性腫瘍を含む）において増加し、かつ細胞周期の間に調節されるので、細胞増殖およびまたは細胞分化を調節する化合物は、20750発現を調節する能力により同定され得る。試験化合物が20750発現を調節するか否かを決定するために、20750を発現する細胞（例えば、肺腫瘍細胞、胸部腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、または対応する正常細胞）を試験化合物と接触させ、そして試験化合物が20750発現を調節する能力を、例えば、ノーザンプロット、定量的P C R（例えば、T a q m a n）、またはインビトロ転写アッセイにより、20750m R N Aを測定することにより決定し得る。インビトロ転写アッセイを実行するために、20750の全長プロモーターおよびエンハンサーを、レポーター遺伝子（例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスクレーバー（C A T）またはルシフェラーゼ）に連結し得、そして宿主細胞に導入し得る。次いで、同じ宿主細胞が、試験化合物でトランスフェクトされ得るかまたは試験化合物と接触され得る。試験化合物の効果は、レポーター遺伝子活性により、およびこの活性をその試験化合物を含まない細胞におけるレポーター遺伝子活性と比較することにより、測定され得る。レポーター遺伝子活性における上昇または低下は、20750発現の調節を示しており、従って、試験化合物が、例えば腫瘍細胞において、細胞増殖および/または細胞分化を調節する能力の指標である。

#### 【0057】

試験化合物が20750発現を調節する能力を試験するための上記アッセイはまた、20750分子が細胞増殖を調節する能力を試験するために使用され得る。試験化合物が20750発現を調節し得る場合、この試験化合物は、細胞増殖（例えば、腫瘍細胞増殖）を最も調節しそうであり得る。

#### 【0058】

インビトロの細胞ベースの癌モデルはまた、20750活性を調節する化合物を同定するため、および/または試験化合物が20750分子の活性を調節する能力を確認するために使用され得る。例えば、細胞株は、腫瘍サプレッサーおよび癌遺伝子（野生型または変異型のp 5 3、S m a d 4、p 1 6、p 1 4、c - m y c およびk - r a sが挙げられるが、これらに限定されず、これらは、癌の進行または阻害（例えば、結腸癌、肺癌、乳癌または卵巣癌の進行または阻害）に関連することが公知である遺伝子である）で、一過的にかまたは安定にトランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞株は、本明細書中に記載される方法を使用して、試験化合物の存在下または非存在下で、20750の発現または活性を評価するために使用され得る。例えば、以下のヒト乳腺上皮細胞株が、インビトロモデルおよび/またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために利用可能である：H M E C、M C F - 7、T - 4 7 D、Z R - 7 5、M D A - M B - 2 3 1、M D A - M B - M C - 2、M D A - M B - 4 3 5、B T - 5 4 9、S k B r 3、M D A - M B - 4 6 8、M C F 1 0 A、M C F 1 0 A T . c 1 1、M C F 1 0 A T . c 1 3、M C F 1 0 A T 1、M C F 1 0 A T 3 B、M C F 1 0 C A 1 . c 1 、H s 5 7 8 T およびH C C 1 9 3 7。以下の結腸細胞株が、インビトロモデルおよび/またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：H C T - 1 1 6、S W 4 8 0、

C C - M L 3、K M 1 2 C、K M 1 2 S M、H T 2 9、D L D - 1、H C C - 2 9 9 8、C O L O - 2 0 5、H C T - 1 5、S W - 6 2 0 および K M 2 0 L 2。以下の肺細胞株が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：N C I - H 3 4 5、N C I - H 6 9 および N C I - H 1 2 5。以下の卵巣細胞株が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：S K O V 3、S K O V 3、O V C A R - 3 および O V C A R - 4。

#### 【0059】

インビトロの細胞ベースの乳癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：k - r a s で形質転換されたM C F 1 0 A 細胞株（乳腺上皮悪性腫瘍の細胞ベースの系）；増殖因子（E G F 増殖因子およびI G F 1 増殖因子を含む）でヒト胸部上皮細胞（M C F 1 0 A）を処理すること、およびH C C 1 9 3 7 細胞へのB R C A 1 発現の再導入。  
10

#### 【0060】

インビトロの細胞ベースの卵巣癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：血清の非存在下で、15分間、30分間および60分間にわたって、上皮増殖因子（E G F）または増殖因子H e r e g u l i n（H r g）のいずれかでの、卵巣癌細胞株（S K O V 3 およびS K O V 3 / 改変体（これらは、シスプラチニ耐性である親S K O V 3 卵巣癌細胞株の改変体である））の処置；ならびに既にヌルの細胞株（S K O V - 3 およびS K O V 3 - V a r）におけるp 5 3 の安定な発現。  
20

#### 【0061】

インビトロの細胞ベースの肺癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：腫瘍サプレッサー モデル（例えば、N C I - H 1 2 5 細胞（p 5 3 についてヌルである肺腫瘍細胞株）へのp 5 3 の再導入；同じ遺伝子座由来の別個の腫瘍サプレッサーであるp 1 6 およびp 1 4（これらは共に、肺腫瘍においては一般にサイレントである）の、肺腫瘍細胞株N C I - H 4 6 0 およびA 5 4 9（これらは、通常、これらの遺伝子の発現を欠く）における発現；ならびに小細胞腫瘍株におけるp R b 遺伝子（これは、小細胞肺癌において一般に欠失している）の発現。他の細胞ベースのモデルとしては、活性化k - r a s 遺伝子で安定に形質転換された気管支上皮細胞株が挙げられる。さらに、増殖因子モデルもまた使用され得る。例えば、N C I - H 6 9 およびN C I - H 3 4 5 小細胞肺癌腫（S C L C）細胞は、広いスペクトルの神経ペプチドレセプターインヒビターとして作用するサブスタンスP アナログ（S P A）で処理され得る。S P A 処理後にダウンレギュレートされた遺伝子に、その発現が腫瘍細胞増殖に必須であるか否かを決定するためのさらなる研究のために、印をつけた（f l a g）。c - k i t チロシンキナーゼレセプターおよびそのリガンドであるS C F の両方を発現するS C L C 細胞を、キナーゼインヒビターS T I - 5 7 1 で処理し得る。このレセプターおよびリガンドの両方を発現する細胞株の5 7 1 処理の際の選択的増殖阻害が実証され、これは、c - k i t チロシンキナーゼレセプターおよびそのリガンドが、腫瘍細胞増殖を刺激するオートクラインフィードバックループにおいて機能することを示唆する。インビトロの細胞ベースの癌モデルは、2 0 7 5 0 活性を調節する化合物を同定するため、および／または試験化合物が2 0 7 5 0 分子の活性を調節する能力を確認するために、使用され得る。例えば、細胞株は、腫瘍サプレッサーおよび癌遺伝子（野生型または変異型のp 5 3、S m a d 4、p 1 6、p 1 4、c - m y c およびk - r a s が挙げられるが、これらに限定されず、これらは、癌の進行または阻害（例えば、結腸癌、肺癌、乳癌または卵巣癌の進行または阻害）に関連することが公知である遺伝子である）で、一過的にかまたは安定にトランスフェクトされ得る。次いで、これらの細胞株は、本明細書中に記載される方法を使用して、試験化合物の存在下または非存在下で、2 0 7 5 0 の発現または活性を評価するために使用され得る。例えば、以下のヒト乳腺上皮細胞が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために利用可能である：H M E C、M C F - 7、T - 4 7 D、Z R - 7 5、M D A - M B - 2 3 1、M D A - M B - M C - 2、M D A - M B - 4 3 5、B T - 5 4 9、S k B r 3、M D A - M B - 4 6 8、M C F 1 0 A、M C F 1 0 A T . c l 1、M C F 1  
30  
40  
50

O A T . c 1 3 、 M C F 1 0 A T 1 、 M C F 1 0 A T 3 B 、 M C F 1 0 C A 1 . c 1 、 H s 5 7 8 T および H C C 1 9 3 7 。以下の結腸細胞株が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：H C T - 1 1 6 、 S W 4 8 0 、 C C - M L 3 、 K M 1 2 C 、 K M 1 2 S M 、 H T 2 9 、 D L D - 1 、 H C C - 2 9 9 8 、 C O L O - 2 0 5 、 H C T - 1 5 、 S W - 6 2 0 および K M 2 0 L 2 。以下の肺細胞株が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：N C I - H 3 4 5 、 N C I - H 6 9 および N C I - H 1 2 5 。以下の卵巣細胞株が、インビトロモデルおよび／またはマウスにおける異種移植片モデルにおいて使用するために、利用可能である：S K O V 3 、 S K O V 3 、 O V C A R - 3 および O V C A R - 4 。

10

## 【 0 0 6 2 】

インビトロの細胞ベースの乳癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：k - r a s で形質転換されたM C F 1 0 A 細胞株（乳腺上皮悪性腫瘍の細胞ベースの系）；増殖因子（E G F 増殖因子およびI G F 1 増殖因子を含む）でヒト胸部上皮細胞（M C F 1 0 A ）を処理すること、およびH C C 1 9 3 7 細胞へのB R C A 1 発現の再導入。

## 【 0 0 6 3 】

インビトロの細胞ベースの卵巣癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：血清の非存在下で、15分間、30分間および60分間にわたって、上皮増殖因子（E G F ）または増殖因子H e r e g u l i n ( H r g ) のいずれかでの、卵巣癌細胞株（S K O V 3 およびS K O V 3 / 改変体（これらは、シスプラチニ耐性である親S K O V 3 卵巣癌細胞株の改変体である））の処理；ならびに既にヌルの細胞株（S K O V - 3 およびS K O V 3 - V a r ）におけるp 5 3 の安定な発現。

20

## 【 0 0 6 4 】

インビトロの細胞ベースの肺癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：腫瘍サプレッサー モデル（例えば、N C I - H 1 2 5 細胞（p 5 3 についてヌルである肺腫瘍細胞株）へのp 5 3 の再導入；同じ遺伝子座由来の別個の腫瘍サプレッサーであるp 1 6 およびp 1 4 （これらは共に、肺腫瘍においては一般にサイレントである）の、肺腫瘍細胞株N C I - H 4 6 0 およびA 5 4 9 （これらは、通常、これらの遺伝子の発現を欠く）における発現；ならびに小細胞腫瘍株におけるp R b 遺伝子（これは、小細胞肺癌において一般に欠失している）の発現。他の細胞ベースのモデルとしては、活性化k - r a s 遺伝子で安定に形質転換された気管支上皮細胞株が挙げられる。さらに、増殖因子モデルもまた使用され得る。例えば、N C I - H 6 9 およびN C I - H 3 4 5 小細胞肺癌腫（S C L C ）細胞は、広いスペクトルの神経ペプチドレセプターインヒビターとして作用するサブスタンスP アナログ（S P A ）で処理され得る。S P A 処理後にダウンレギュレートされた遺伝子に、その発現が腫瘍細胞増殖に必須であるか否かを決定するためのさらなる研究のために、印をつけた（f l a g ）。c - k i t チロシンキナーゼレセプターおよびそのリガンドであるS C F の両方を発現するS C L C 細胞を、キナーゼインヒビターS T I - 5 7 1 で処理し得る。このレセプターおよびリガンドの両方を発現する細胞株の5 7 1 処理の際の選択的増殖阻害が実証され、これは、c - k i t チロシンキナーゼレセプターおよびそのリガンドが、腫瘍細胞増殖を刺激するオートクラインフィードバックループにおいて機能することを示唆する。

30

## 【 0 0 6 5 】

インビトロの細胞ベースの結腸癌モデルとしては、例えば、以下が挙げられる：S m a d 4 で安定にかまたは一過的にトランスフェクトされたS W 4 8 0 細胞。S m a d 4 は、結腸癌腫のサブセットにおいて変異している候補腫瘍サプレッサー遺伝子である。S m a d 4 は、T G F - β 分子のシグナル伝達において機能する。T G F - β スーパーファミリーは、増殖阻害に関与することが周知である。結腸細胞株におけるS m a d 4 の変異／欠失は、S m a d 4 が細胞接着および浸潤の調節因子であり得るという仮説を提供する。本発明の方法において有用な別の細胞株は、β - カテニンで安定にかまたは一過的にトランスフェクトされたN C M 4 2 5 細胞である。A P C 遺伝子の変異は、結腸直腸癌の散発性の

40

50

形態および家族性形態での、腫瘍形成の原因である。A P Cは、- カテニンに結合し、そして - カテニンの細胞質レベルを調節する。A P Cが変異している場合、- カテニンは、細胞質中に蓄積し、そして核に転移する。一旦核に入ると、- カテニンは、L E F / T C F分子と相互作用し、そして遺伝子発現を調節する。- カテニン / L E F ( 例えれば、c - m y c およびサイクリンD 1 )複合体によって調節される遺伝子は、腫瘍形成に関与する。p 5 3で安定にかまたは一過的にトランスフェクトされた細胞もまた、本発明の方法において有用である。p 5 3は、結腸直腸癌腫瘍の50%より多くにおいて変異している周知の腫瘍サプレッサーである。本発明の方法において有用ななお他の細胞株としては、N C M 4 2 5 結腸癌細胞への、W I S P - 1の一過的または安定なトランスフェクション、種々の細胞への D C C 、C o x 2 および / またはA P Cの一過的または安定なトランスフェクションが挙げられる。

10

20

30

40

## 【 0 0 6 6 】

H C T - 1 1 6 およびD L D - 1 のような細胞株はまた、k - r a s で形質転換され得、そして本発明の方法において使用され得る。k - r a s 癌遺伝子を活性化する点変異は、ヒト結腸癌の50%で見出される。活性化k - r a s は、結腸直腸腫瘍において細胞増殖を調節し得る。H C T - 1 1 6 細胞およびD L D - 1 細胞において活性化k - r a s 対立遺伝子を破壊することは、分化を形態学的に変更し、足場非依存的な増殖の喪失を引き起こし、インピトロおよびインピボでの増殖を遅延させ、そしてc - m y c の発現を減少させる。2 0 7 5 0 の発現は、k - r a s が破壊されたH C T - 1 1 6 細胞においてダウントレギュレートされることが見出された。

## 【 0 0 6 7 】

細胞周期調節およびそのチェックポイントにおける異常は、悪性細胞の発生を導く。細胞増殖および細胞周期停止を調節するシグナルに細胞が応答する能力の喪失は、癌の共通の機構である。従って、細胞周期内の特定の時点の研究について、細胞株( 例えれば、結腸癌細胞株であるH C T 1 1 6 、D L D - 1 およびN C M 4 2 5 )は、例えば、薬剤( 例えれば、ミモシン( m i m o s i n e ) ( G 1 ブロック) , ミモシン( G 1 / S ブロック) およびノコダゾール( n o c o d a z o l e ) ( G 2 / M ブロック) )を用いて同調され得る。p 5 3 状態に関連する細胞同調はまた、種々のp 5 3 状態の細胞( S K O V - 3 ( ヌル ) 、O V C A R - 3 またはO V C A R - 4 ( 変異体 ) およびH E Y ( 野生型 ) )においても研究され得る。

## 【 0 0 6 8 】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、2 0 7 5 0 タンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させ、そして試験化合物が2 0 7 5 0 タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはそれらの活性を調節( 例えれば、刺激または阻害 )する能力を決定する、無細胞アッセイである。本発明のアッセイに使用するための2 0 7 5 0 タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分としては、非2 0 7 5 0 分子との相互作用に関与するフラグメント( 例えれば、高い表面確立スコアを有するフラグメント )が挙げられる。2 0 7 5 0 タンパク質に対する試験化合物の結合は、上記のように、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで決定され得る。2 0 7 5 0 タンパク質が試験化合物に結合する能力を決定することはまた、リアルタイム生体分子相互作用分析( B i o m o l e c u l a r I n t e r a c t i o n A n a l y s i s ( B I A ) )のようないくつかの技術を使用して達成され得る( S j o l a n d e r , S . およびU r b a n i c z k y , C . ( 1 9 9 1 ) A n a l . C h e m . 6 3 : 2 3 3 8 - 2 3 4 5 ; S z a b o うら ( 1 9 9 5 ) C u r r . O p i n . S t r u c t . B i o l . 5 : 6 9 9 - 7 0 5 )。本明細書中で使用する場合、「B I A」は、いずれの相互作用物をも標識せずに、リアルタイムで生体特異的な相互作用を研究するための技術である( 例えれば、B I A c o r e )。表面プラズモン共鳴( S P R )の光学的現象における変化は、生体分子間のリアルタイム反応を示すものとして使用され得る。

## 【 0 0 6 9 】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多くの実施形態において、2 0 7 5 0 または2 0 7

50

50の標的分子のいずれかを固定化して、タンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を容易にし、そしてアッセイの自動化に適応させることが、望ましくあり得る。試験化合物の存在下および非存在下における、20750タンパク質に対する試験化合物の結合、または20750標的分子との20750タンパク質の相互作用は、反応物を含むのに適した任意の容器において達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方をマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/20750の融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的の融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、これらを、試験化合物と混ぜ合わせるか、あるいは試験化合物および非吸着標的タンパク質または20750タンパク質のいずれかと混ぜ合わせ、そしてこの混合物を、複合体形成に貢献する条件下(例えば、塩およびpHに関して生理学的条件)でインキュベートし得る。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば、上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離させ得、そして20750結合レベルまたは20750活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。

10

20

## 【0070】

タンパク質をマトリックス上に固定するための他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、20750タンパク質または20750標的分子のいずれかは、ビオチンとストレプトアビシンとの結合体化を使用して固定され得る。ビオチン化された20750タンパク質または20750標的分子を、当該分野において公知の技術を使用して、ビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製し得(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)、そしてストレプトアビシンでコーティングした96ウェルのプレート(Pierce Chemical)のウェル中に固定し得る。あるいは、20750タンパク質または20750標的分子と反応性であるが、20750タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的または20750タンパク質が、抗体結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体に関する上記のものに加えて、20750タンパク質または標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびに20750タンパク質または標的分子に関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

30

40

## 【0071】

本発明のなあ別の局面において、20750タンパク質またはそのフラグメントは、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら、(1993)Cell 72:223~232; Madauraら(1993)J. Biol. Chem. 268:12046~12054; Bartelら(1993)Biotechniques 14:920~924; Iwabuchiら(1993)Oncogene 8:1693~1696; およびBrent WO94/10300を参照のこと)において、20750と結合または相互作用し、20750活性に関与する他のタンパク質(「20750結合タンパク質」または「20750-bp」)を同定するために「ベイト(bait)タンパク質」として使用され得る。そのような20750結合タンパク質は、例えば、20750媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、20750タンパク質または20750標的によるシグナルの伝達に関与している可能性もある。あるいは、そのような20750結合タンパク質は、20750インヒビターである可能性がある。

50

## 【0072】

このツーハイブリッドシステムは、ほとんどの転写因子のモジュラー型の性質に基づく。ほとんどの転写因子は、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。簡単に述べると、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、20750タンパク質をコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ（play）」または「サンプル」）をコードするDNA配列ライブラリー由来のDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」タンパク質と「プレイ」タンパク質とがインビオで相互作用して20750依存性複合体を形成し得る場合、その転写因子のDNA結合ドメインと活性化ドメインとは、近接する。このように近くにあることにより、その転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結したレポーター遺伝子（例えば、lacZ）の転写が可能になる。このレポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてその機能的な転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そして20750タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

10

20

30

**【0073】**

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイのうちの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節因子が、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そしてその因子が20750タンパク質の活性を調節する能力が、（例えば、動物（例えば、細胞増殖障害（例えば、癌）についての動物モデル）において）インビオで確認され得る。癌の動物モデルの例としては、移植可能モデル（例えば、異種移植）が挙げられる。結腸癌についての異種移植は、以下の細胞株を用いて実施され得る：HCT-116、HT-29、SW-480、SW-620、Colon 26、DLD1、Caco2、colon 205、T84およびKM12。肺癌についての異種移植は、以下の細胞株を用いて実施され得る：NCI-H125、NCI-H460、A549、NCI-H69およびNCI-H345。卵巣癌についての異種移植は、SKOV3細胞株およびHEY細胞株を用いて実施され得る。乳癌についての異種移植は、例えば、MCF10AT細胞（これは、マウスにおける皮下または同所（清浄化された乳腺脂肪パッド）異種移植片として、増殖され得る）を用いて実施され得る。MCF10AT異種移植片は、ヒト乳癌と類似の様式で進行する腫瘍を生じる。エストロゲン刺激もまた、このモデルにおいて腫瘍進行を加速することが示されている。過形成、インサイチュ癌腫および浸潤性癌腫の病期を示すMCF10AT異種移植腫瘍は、発現プロファイリングにより単離される。ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231の転移性サブクローニング（これは、脳、肺および骨に転移する）はまた、種々の部位（すなわち、皮下、同所、直接的骨注射後の骨、心臓内注射の後の骨）において、インビトロおよびインビオで増殖され得る。MCF-7およびT-47Dは、異種移植片として増殖され得る他の乳腺癌細胞株である。これらの細胞株は、全て、例えば、免疫無防備状態のマウス（例えば、SCIDまたはヌードマウス）に移植され得る。

40

**【0074】**

同所転移マウスマodelもまた、利用され得る。例えば、HCT-116ヒト結腸癌腫細胞株は、無胸腺ヌードマウスにおいて、皮下異種移植片または同所異種移植片（鞘内（intracaeal）注射）として増殖され得る。稀な肝臓および肺の転移物が単離され、インビトロで増殖され、そしてインビオで再移植され得る。限定された反復回数のこのプロセスを使用して、親細胞株の高度に転移性の変形体を単離し得る。標準的cDNAライブラリーおよびサブトラクティドcDNAライブラリーならびにプローブは、転移性表現型の獲得に関連する遺伝子を同定するために、親細胞株および変形体細胞株から生成され得る。このモデルは、いくつかの代替的なヒト結腸癌腫細胞株（SW480およびKM12Cを含む）を使用して、確立され得る。

50

**【0075】**

ミスマッチ修復モデル（MMR）もまた、本発明の方法において有用である。遺伝性非ポリポーラス性結腸癌（HNPPCC）（これは、DNAミスマッチ修復に関与するMSH2

50

遺伝子およびMLH1遺伝子における、生殖系列変異によって引き起こされる)は、結腸癌の症例の5~15%を占める。MLH1遺伝子、MSH2遺伝子およびMSH3遺伝子においてヌル変異を保有するマウスモデルが、作製されている。

### 【0076】

癌についての他の動物モデルとしては、以下が挙げられる:トランスジェニックモデル(例えば、B66-Min/+マウス);化学物質誘導モデル(例えば、発癌物質(例えば、アゾキシメタン(azoxymethane)、2-ジメチルヒドラジンまたはN-ニトロソジメチルアミン)処置されたラットまたはマウス);Rashidiら(2000)Anticancer Res 20(2A):715によって記載されるような、結腸癌からの肝臓転移のモデル;ならびに例えば、Fingerertら(1987)Cancer Res 46(14):3824-9およびTeraokar(1995)Jpn J Cancer Res 86(5):419-23に記載されるような、癌細胞移植モデルまたは接種モデル。さらに、実験的モデル系が、以下の研究のために利用可能である(例えば、卵巣癌(Hamilton, Tから、Semin Oncol(1984)11:285-298; Rahman, Nら、Mol Cell Endocrinol(1998)145:167-174; Beamer, W Gら、Toxicol Pathol(1998)26:704-710))、胃癌(Thompson, Jら、Int J Cancer(2000)86:863-869; Fodde, Rら、Cytogenet Cell Genet(1999)86:105-111)、乳癌(Li, Mら、Oncogene(2000)19:1010-1019; Green, J Eら、Oncogene(2000)19:1020-1027)、黒色腫(Satyamoorthy, Kら、Cancer Metast Rev(1999)18:401-405)、および前立腺癌(Shirai, Tら、Mutat Res(2000)462:219-226; Bostwick, D Gら、Prostate(2000)43:286-294)。結腸癌についてのマウスモデルとしては、APC<sup>min</sup>マウス(これは、ヒト結腸直腸癌種の高度に特徴付けられた遺伝的モデルである);APC<sup>1638N</sup>マウス(これは、APC遺伝子のコドン1638においてPGK-ネオマイシン遺伝子を導入することによって作製され、そして、6~8週後に異常な陰窩葉(cryptfolia)を発症し、これは、4ヶ月齢までに、最終的に癌腫に進行する);およびSmad3<sup>-/-</sup>マウス(これは、組織病理学的にヒト疾患に類似する結腸癌種を発症する)。

### 【0077】

インビボにおける腫瘍形成を研究するための他の動物ベースのモデルは、当該分野で周知であり(Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes, Hiai, H. およびHino, O. (編) 1999, Progress in Experimental Tumor Research, Vol. 35; Clarke AR Carcinogenesis(2000)21:435-441において概説される)、そして例えば、以下が挙げられる:発癌物質誘導性の腫瘍(Rithidech, Kら、Mutat Res(1999)428:33-39; Miller, M Lら、Environ Mol Mutagen(2000)35:319-327)ならびに増殖調節遺伝子(例えば、癌遺伝子(例えば、ras))に(Arbeit, J Mら、Am J Pathol(1993)142:1187-1197; Sinn, Eら、Cell(1987)49:465-475; Thorgerirsson, S Sら、Toxicol Lett(2000)112-113:553-555)および腫瘍サプレッサー遺伝子(例えば、p53)(Vooijis, Mら、Oncogene(1999)18:5293-5303; Clark AR Cancer Metast Rev(1995)14:125-148; Kumar, T Rら、J Intern Med(1995)238:233-238; Donehower, L Aら(1992)Nature 356215-221)において変異を有する動物(例えば、ラット)。

10

20

30

40

50

**【 0 0 7 8 】**

さらに、本発明は、本明細書中に記載されるような処置のための、上記スクリーニングアッセイによって同定された新規化合物の使用に関する。1実施形態において、本発明は、細胞増殖(growthまたはproliferation)障害を有する被験体を処置する方法を特徴とし、この方法は、処置が生じるよう、20750調節因子を被験体に投与する工程を包含する。別の実施形態において、本発明は、癌(例えば、結腸癌、肺癌または卵巣癌)を有する被験体を処置する方法を特徴とし、この方法は、処置が生じるよう、20750調節因子を用いて被験体を処置する工程を包含する。好みの20750調節因子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 20750タンパク質または生物学的に活性なフラグメント、20750核酸分子、20750抗体、リボザイムおよび本明細書中に開示される20750ヌクレオチド配列に基づいて設計された20750アンチセンスオリゴヌクレオチド、ならびに例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイの少なくとも1つに従って、20750の発現および/または活性を調節し得るとして同定されたペプチド、有機および非有機の低分子。

**【 0 0 7 9 】**

さらに、本明細書中に記載されるように同定された20750調節因子(例えば、アンチセンス20750核酸分子、20750特異的抗体または低分子)は、このような調節因子での処置の効力、毒性または副作用を決定するために、動物モデルにおいて使用され得る。あるいは、本明細書中に記載されるように同定された20750調節因子は、このような調節因子の作用機構を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。

**【 0 0 8 0 】**

任意の化合物(上記アッセイ系において同定された化合物のような化合物を含むが、これらに限定されない)は、細胞の増殖障害の症状を緩和する能力について試験され得る。細胞増殖障害系を緩和するこのような能力を示す化合物の同定のための、細胞ベースのアッセイおよび動物モデルベースのアッセイは、本明細書中に記載される。

**【 0 0 8 1 】**

1つの局面において、本明細書中に記載されるような細胞ベースの系は、細胞増殖障害の症状を緩和する(例えば、腫瘍負荷、腫瘍サイズ、腫瘍細胞増殖、分化および/または増殖、ならびに処置の前後の浸潤能および/または転移能の低下)ように作用し得る化合物を同定するために使用され得る。例えば、このような細胞系は、細胞増殖障害の症状を緩和する能力を有することが疑われる化合物に、曝露された細胞における細胞増殖障害の症状の緩和を誘発するのに十分な濃度および十分な時間で、曝露され得る。曝露後、細胞は、細胞増殖障害の細胞表現型の1つ以上が、より正常またより野生型の、非細胞増殖障害の表現型に似るように変更されたか否かを決定するために、試験される。細胞増殖障害に関連する細胞表現型としては、異常な増殖、成長および移動、足場非依存的増殖および接触阻害の喪失が挙げられる。

**【 0 0 8 2 】**

さらに、動物ベースの細胞増殖障害系(例えば、本明細書中に記載されるもの)は、細胞増殖障害の症状を緩和し得る化合物を同定するために使用され得る。このような動物モデルは、薬物、薬剤、治療および介入(細胞増殖障害を処置する際に有効であり得る)の同定のための試験物質として使用され得る。例えば、動物モデルは、細胞増殖障害の症状を緩和する能力を示すことが疑われる化合物に、曝露された動物における細胞増殖障害の症状のこのような緩和を誘発するのに十分な濃度および十分な時間で、曝露され得る。曝露に対する動物の応答は、細胞増殖障害またはそれに関連する症状の逆転(腫瘍負荷、腫瘍サイズ、ならびに処置の前後の浸潤能および/または転移能の減少)を評価することによって、モニタリングされ得る。

**【 0 0 8 3 】**

本発明について、細胞増殖障害の症状の任意の局面を逆転する任意の処置は、ヒトの細胞増殖障害の治療的介入についての候補とみなされるべきである。試験化合物の投薬量は、用量-応答曲線を誘導することによって、決定され得る。

**【 0 0 8 4 】**

さらに、遺伝子発現パターンは、化合物が細胞増殖障害の症状を緩和する能力を評価するために利用され得る。例えば、1つ以上の遺伝子の発現パターンは、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」(これらは、次いで、このような評価において使用され得る)の一部を形成し得る。「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、本明細書中で使用する場合、所定の条件セット下で、所定の組織または細胞型について得られたmRNA発現のパターンを含む。このような条件としては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：細胞の成長、増殖、分化、形質転換、腫瘍形成、転移および発癌物質曝露。遺伝子発現プロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ手順、ノーザン分析および/またはRT-PCRを利用することによって、作製され得る。1実施形態において、20750遺伝子配列は、このような遺伝子発現プロファイルの生成および確認のための、プローブおよび/またはPCRプライマーとして使用され得る。

10

20

30

40

50

**【 0 0 8 5 】**

遺伝子発現プロファイルは、細胞ベースのモデル系および/または動物ベースのモデル系において、既知の状態について特徴づけられ得る。引き続き、これらの既知の遺伝子発現プロファイルは、試験化合物が、このような遺伝子発現プロファイルを改変し、そしてプロファイルを、より所望されるプロファイルにより密接に類似させる効果を有することを確認するために、比較され得る。

**【 0 0 8 6 】**

例えば、化合物の投与は、細胞増殖障害モデル系の遺伝子発現プロファイルを、コントロール系により密接に類似させ得る。あるいは、化合物の投与は、コントロール系の遺伝子発現プロファイルに、細胞増殖障害状態を模倣し始めさせ得る。このような化合物は、例えば、目的の化合物をさらに特徴付けるために使用され得るか、またはさらなる動物モデルの作製において使用され得る。

**【 0 0 8 7 】****( I I . 予測医学 )**

本発明はまた、予測医学の分野に関する。この分野において、診断アッセイ、予後アッセイ、およびモニタリング臨床試験が、予後(予測)目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞または組織(例えば、腫瘍または癌の組織))に関して、20750タンパク質および/または核酸の発現、ならびに20750活性を決定し、それによって、個体が、細胞増殖障害に罹患しているか否かを決定するための、診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が細胞増殖障害を発症する危険性があるか否かを決定するための、予後(または予測)アッセイを提供する。例えば、20750遺伝子における変異が、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後目的または予測目的のために使用され得、それによって個体は、細胞増殖障害の発症前に、予防的に(phophylactically)処置される。

**【 0 0 8 8 】**

本発明の別の局面は、臨床試験における、20750の発現または活性に対する20750調節因子(例えば、抗20750抗体または20750リボザイム)の影響のモニタリングに関する。

**【 0 0 8 9 】**

これらおよび他の薬剤は、以下の節で、さらに詳細に記載される。

**【 0 0 9 0 】****( A . 細胞増殖障害についての診断アッセイ )**

被験体が、細胞増殖障害に罹患しているか否かを決定するために、生物学的サンプルは被験体から獲得され得、そしてこの生物学的サンプルは、この生物学的サンプル中の20750タンパク質または20750タンパク質をコードする核酸(例えば、mRNAまたはゲノムDNA)を検出し得る化合物または薬剤と接触され得る。20750 mRNAま

たはゲノムDNAを検出するのに好ましい薬剤は、20750 mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、配列番号1に示される20750核酸またはそれらの一部（例えば、少なくとも15、20、25、30、25、40、45、50、100、250または500ヌクレオチド長であり、ストリンジエントな条件下で、20750 mRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチド）であり得る。本発明の診断アッセイにおいて使用するのに適切な他のプローブが、本明細書中に記載されている。

#### 【0091】

サンプル中の20750タンパク質を検出するのに好ましい薬剤は、20750タンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であり得、より好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')2）が、使用され得る。用語「標識」は、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をプローブまたは抗体に連結（すなわち、物理的に連結）することによるこのプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接的に標識された別の試薬との反応性によるこのプローブまたは抗体の間接的な標識を包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るような、ビオチンでのDNAプローブの末端の標識の検出が挙げられる。

#### 【0092】

用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞、および生物学的流体、ならびに被験体内に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロおよびインビボで、生物学的サンプル中の20750 mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出し得る。例えば、20750 mRNAを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。20750のタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、ウエスタンプロット、免疫沈降、および免疫蛍光検査法が挙げられる。20750のゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、20750のタンパク質を検出するためのインビボ技術としては、被験体への標識抗20750抗体の導入が挙げられる。例えば、抗体は、被験体における存在および位置が、標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーを用いて、標識され得る。

#### 【0093】

別の実施形態において、本方法はさらに、コントロール被験体からのコントロール生物学的サンプルを獲得する工程、コントロールサンプルと、20750タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤とを接触させる工程（その結果、20750タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在が、生物学的サンプルにおいて検出される）、およびコントロールサンプル中の20750タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と、試験サンプル中の20750タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

#### 【0094】

（B. 細胞増殖障害についての予後アッセイ）

本発明はさらに、異常な20750発現または活性に関連する細胞増殖障害を発症する危険を有する被験体を同定するための方法に関する。

#### 【0095】

本明細書中で使用される場合、用語「異常な」は、野生型の20750の発現または活性から逸脱した、20750の発現または活性を含む。異常な発現または活性としては、発現もしくは活性の増加または減少、ならびに野生型の発現の発生的パターンまたは細胞下の発現のパターンに従わない、発現または活性が挙げられる。例えば、異常な20750の発現または活性は、20750遺伝子が、20750遺伝子における変異によって過少

10

20

30

40

50

発現または過剰発現される状況、ならびにこのような変異によって、非機能的 20750 タンパク質または野生型の様式で機能しないタンパク質（例えば、20750 基質と相互作用しないタンパク質、または非 20750 基質と相互作用するタンパク質）を生じる状況を含むことが意図される。

#### 【0096】

本明細書中で記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは後述のアッセイ）は、細胞増殖障害（例えば、結腸癌、肺癌および卵巣癌のような、癌）を有するかまたはそれを発症する危険を有する被験体を同定するために使用され得る。生物学的サンプルは、被験体から獲得され得、そして遺伝的変更の存在または非存在について試験され得る。例えば、このような遺伝的変更は、以下の少なくとも 1 つの存在を確認することにより検出され得る：1) 20750 遺伝子からの 1 つ以上のヌクレオチドの欠失；2) 20750 遺伝子への 1 つ以上のヌクレオチドの付加；3) 20750 遺伝子の 1 つ以上のヌクレオチドの置換；4) 20750 遺伝子の染色体再構築；5) 20750 遺伝子のメッセンジャー RNA 転写物レベルの変更；6) ゲノム DNA のメチル化パターンのような、20750 遺伝子の異常な改変；7) 20750 遺伝子のメッセンジャー RNA 転写物の非野生型スプライシングパターンの存在；8) 20750 タンパク質の非野生型レベル；9) 20750 遺伝子の対立遺伝子喪失；および 10) 20750 タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

#### 【0097】

本明細書中に記載されるように、20750 遺伝子における遺伝的変更を検出するために使用され得る多くのアッセイが、当該分野において公知である。例えば、20750 遺伝子の遺伝的変更は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第 4,683,195 号および同第 4,683,202 号を参照のこと）（例えば、アンカー PCR または RACE PCR）、あるいは、ライゲーション連鎖反応（LCR）（例えば、Landegranら（1988）Science 241:1077-1080；および Nakazawaら（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364 を参照のこと）におけるプローブ／プライマーを使用して検出され得、これらのうちの後者は、20750 遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（Abravayaら（1995）Nucleic Acids Res. 23:675-682 を参照のこと）。この方法は、被験体から生物学的サンプルを収集する工程、このサンプルから核酸（例えば、ゲノム DNA、mRNA またはこれらの両方）を単離する工程、（存在するならば）20750 遺伝子のハイブリダイゼーションおよび增幅が生じるような条件下で、この核酸サンプルを、20750 遺伝子に特異的にハイブリダイズする 1 つ以上のプライマーと接触させる工程、ならびに增幅産物の存在または非存在を検出するかあるいは增幅産物のサイズを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含する。PCR および / または LCR が、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される任意の技術と組合わせて予備的增幅工程として使用するに好ましくあり得ることが、予測される。

#### 【0098】

代替の增幅法としては以下が挙げられる：自己維持的配列複製（self-sustained sequence replication）（Guatelli, J. C. ら（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写增幅系（Kwoh, D. Y. ら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-レプリカーゼ（Lizardi, P. M. ら（1988）Bio-Technology 6:1197）、または他の核酸增幅法のいずれか、その後の当業者に周知の技術を使用する增幅分子の検出。これらの検出スキームは、このような分子が非常に少数で存在する場合に、核酸分子の検出に特に有用である。

#### 【0099】

代替の実施形態において、生物学的サンプル由来の 20750 遺伝子における変異は、制

10

20

30

40

50

限酵素切斷パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが、単離され、(必要に応じて)増幅され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長サイズが、ゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの差異は、サンプルDNA中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム(例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと)の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失によって、特定の変異の存在についてスコア付けするために使用され得る。

#### 【0100】

他の実施形態において、20750中の遺伝的変異が、数百個または数千個のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイ(Cronin, M. T.ら(1996)Human Mutation 7:244-255; Kozal, M. J.ら(1996)Nature Medicine 2:753-759)に対して、生物学的サンプル由來の核酸およびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)をハイブリダイズすることによって、同定され得る。例えば、20750における遺伝的変異は、Cronin, M. T.ら((1996)(前出)に記載されるような光生成DNAプローブを含む2次元アレイ中で同定され得る。簡単にいうと、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイが、連続的な重複プローブの線形アレイを作成することによって配列間の塩基変化を同定するために、サンプル中およびコントロール中の長いDNAストレッチ全体にわたり走査するために使用され得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の後、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さく、特定化されたプローブアレイを使用することによって、特定の変異の特徴付けを可能にする第2ハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、平行プローブセットから構成され、一方は、野生型遺伝子に相補的であり、そして他方は、変異遺伝子に相補的である。

#### 【0101】

なお別の実施形態において、当該分野で公知である任意の種々の配列決定反応が、生物学的サンプル中の20750の配列を、対応する野生型(コントロール)配列と比較することによって、生物学的サンプル中の20750遺伝子の直接的な配列決定および変異の検出に使用され得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560またはSanger(1977)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463により開発された技術に基づく反応が挙げられる。任意の種々の自動化配列決定手順が、質量分析法による配列決定(例えば、PCT国際公開番号WO94/16101; Cohenら(1996)Adv. Chromatogr. 36:127-162; およびGriffithsら(1993)Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159を参照のこと)を含む診断アッセイ(Naeye, C. W. (1995)Biotechniques 19:448-53)を行う場合に利用され得ることもまた、企図される。

#### 【0102】

20750遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、RNA/RNA異種二重鎖またはRNA/DNA異種二重鎖中でミスマッチした塩基を検出するために切断剤からの保護が使用される方法が挙げられる(Myersら(1985)Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の分野の技術は、野生型20750配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルより得られた潜在的変異RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成される異種二重鎖を提供することによって、開始する。この二本鎖二重鎖は、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二本鎖の一本鎖領域を切断する因子で処理される。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、RNA/DNA二重鎖はRNaseで処理され得、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理され得る。他の実施形態において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二重鎖のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで処理され得、そして、ミスマッチ領域を消

化するためにペペリジンで処理され得る。ミスマッチ領域の消化後、次いで、生じた物質が、変異部位を決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズで分けられる。例えば、Cottonら(1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397およびSaleebaら(1992) Methods Enzymol. 217:286-295を参照のこと。好ましい実施形態において、コントロールDNAまたはRNAが、検出のために標識され得る。

#### 【0103】

さらに別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルより得られた20750 cDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(「DNAミスマッチ修復」酵素と呼ばれる)を使用する。例えば、*E. coli*のmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994) Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示的実施形態に従って、20750配列(例えば、野生型の20750配列)に基くプローブは、試験細胞からのcDNA産物または他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素で処理され、そして存在する場合、切断産物は、電気泳動的プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

#### 【0104】

他の実施形態において、電気泳動的移動度の変更を使用して、20750遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォーメーション多型(SSCP)を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動的移動度の差異を検出し得る(Oritaら(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86:2766; Cotton(1993) Mutat. Res. 285:125-144およびHayashi(1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79もまた参考のこと)。サンプルおよびコントロールの20750核酸の一本鎖DNAフラグメントは変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動的移動度において生じた変更は、単一の塩基変化の検出さえ可能にする。DNAフラグメントは、標識されたプローブで標識されても検出されてもよい。このアッセイの感度は、(DNAではなく)RNAを用いることにより増強され得、ここで二次構造は、配列の変化により感受性である。好ましい実施形態において、目的の方法は、電気泳動的移動度の変化に基いて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を利用する(Keenら(1991) Trends Genet 7:5)。

#### 【0105】

なお別の実施形態において、変性剤の勾配を含有するポリアクリルアミドゲル中の変異体フラグメントまたは野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動(DGGE)(Myersら(1985) Nature 313:495)を使用してアッセイされる。DGGEが分析法として使用される場合、DNAは、例えば、PCRによって約40bpの高温融解GCリッチDNAのGCクランプを付加することにより完全には変性していないことを確認するために改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロールDNAおよびサンプルDNAの移動度の差異を同定するための変性勾配の代わりに使用される(RosenbaumおよびReissner(1987) Biophys Chem 265:12753)。

#### 【0106】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的增幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得、ここで、公知の変異が中心におかれ、次いで、完全な一致が見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズする(Saikiら(1986) Nature 324:163); Saikiら(1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86:1629-1633。

10

20

30

40

50

Sci USA 86 : 6230)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合しそして標識標的DNAとハイブリダイズする場合に、PCR增幅標的DNAまたは多くの種々の変異にハイブリダイズされる。

#### 【0107】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と組み合わせて使用され得る。増幅に特異的なプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の変異を保有し得るか（その結果、増幅は、差示的ハイブリダイゼーションに依存する）(Gibbsら(1989) Nucleic Acids Res. 17 : 2437 - 2448)、または適切な条件下で、ミスマッチが、防がれ得るかまたはポリメラーゼ伸長を低減され得る場合、一方のプライマーの3'末端で目的の変異を保有し得る(Prossner(1993) Tibtech 11 : 238)。さらに、切断ベース検出を作製するために、変異領域中に新規の制限部位を導入することが、好ましくあり得る(Gaspariniら(1992) Mol. Cell Probes 6 : 1)。特定の実施形態において、増幅のためにTaqリガーゼを使用して増幅が行われることもまた、明らかである(Barany(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 189)。このような場合に、連結は、5'配列の3'末端で完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅の存在または非存在を探索することによって特定の部位で既知の変異の存在を検出し得る。

#### 【0108】

さらに、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して、細胞増殖障害を効果的に処置するために、被験体が20750モジュレーター（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸または低分子）を投与され得るか否かを、決定し得る。

#### 【0109】

##### (C. 臨床試験の間の効果のモニタリング)

本発明はさらに、20750モジュレーター（例えば、本明細書中において同定された20750モジュレーター）の、被験者における細胞増殖障害の処置に対する有効性を決定するための方法を提供する。例えば、20750遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは20750活性のアップレギュレートにおいて、20750モジュレーターの有効性は、20750遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは20750活性のダウンレギュレートを示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。あるいは、20750遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは20750活性のダウンレギュレートにおける20750モジュレーターの有効性は、20750遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは20750活性の増加を示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。このような臨床試験において、20750遺伝子、および好ましくは、例えば、細胞増殖障害に関係付けられている他の遺伝子の発現または活性が、「読み出し」すなわち特定の細胞の表現型のマーカーとして使用され得る。

#### 【0110】

例えば（限定のためではなく）、（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）20750活性を調節する因子での処置によって細胞において調節される、20750を含む遺伝子が、同定され得る。よって、細胞増殖障害を罹患する被験体に対する20750活性を調節する因子の効果を（例えば、臨床試験において）研究するために、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、20750および細胞増殖障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子発現レベル（例えば、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるようなノーザン blot分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載される方法の1つによって生成されるタンパク質の量を測定することによって、または20750もしくは他の遺伝子の活性レベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、遺伝子発現パターンは、20750活性を調節する因子に対する細胞の生理学的応答を示すマーカ

10

20

30

40

50

ーとして働き得る。この応答状態は、個体を 20750 活性を調節する因子で処置する前、あるいはその間の種々の時点で測定され得る。

#### 【0111】

好みしい実施形態において、本発明は、20750 活性を調節する因子（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される低分子）での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供し、以下の工程を包含する：(i) この因子の投与前に投与前サンプルを被験体から得る工程；(ii) この投与前サンプル中の 20750 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNA の発現レベルを検出する工程；(iii) 1 つ以上の投与後サンプルを被験体から得る工程；(iv) これらの投与後サンプル中の 20750 タンパク質、mRNA、またはゲノムDNA の発現レベルまたは活性レベルを検出する工程；(v) 投与前サンプル中の 20750 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNA の発現レベルまたは活性レベルを、投与後サンプル中の 20750 のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNA の発現レベルまたは活性レベルと比較する工程；ならびに(vi) 被験体に対する因子の投与を然るべく変更する工程。例えば、因子の投与増加は、20750 の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を増加させる）レベルよりも高いレベルに増加することが、好みしくあり得る。あるいは、因子の投与減少は、20750 の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を減少させる）レベルよりも低いレベルに減少することが、好みしくあり得る。この実施形態に従って、20750 の発現または活性は、観察可能な表現型応答の非存在下ですら、因子の有効性の指標として使用され得る。10 20

#### 【0112】

(III. 細胞増殖障害に罹患している被験体の処置方法)  
本発明は、細胞増殖障害（例えば、結腸癌、肺癌、または卵巣癌のような癌）の危険性がある（またはこの障害になりやすい）被験体（例えば、ヒト）を処置するための予防方法および治療方法の両方を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「処置」とは、疾患もしくは障害、疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは症状への素因を有する患者への治療剤の適用もしくは投与、またはその患者から単離された組織もしくは細胞株への治療剤の適用もしくは投与であって、その疾患もしくは障害、その疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害（例えば、細胞増殖障害）への素因を治療（cure）、治癒（heal）、緩和（alleviate）、軽減（relieve）、変更（alter）、矯正（remedy）、改良（ameliorate）、改善（improve）するかもしくは影響を与える（affect）ことを目的とする適用もしくは投与と定義される。治療剤としては、低分子、ペプチド、抗体、リボザイム、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。30

#### 【0113】

予防的処置法および治療的処置法の両方に關して、このような処置は、薬理ゲノム学（pharmacogenomics）の分野から得られる知識に基いて、特異的に調整または改変され得る。本明細書中で使用される場合、「薬理ゲノム学」とは、臨床開発および市場での薬物に対する、遺伝子配列決定、統計遺伝学および遺伝子発現分析のようなゲノミクス技術の適用をいう。より詳細には、この用語は、患者の遺伝子が薬物に対する患者の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）をどのように決定するのかについての研究をいう。40

#### 【0114】

従って、本発明の別の局面は、個体の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の 20750 分子または 20750 調節因子のいずれかを用いるその被験体の予防処置または治療処置を調整するための方法を提供する。薬理ゲノム学によって、臨床家または内科医が、この処置から最も利益を得る患者に対して予防処置または治療処置を標的化することが可能になり、そして毒性薬物関連副作用を被る患者の処置を避けることが可能になる。

#### 【0115】

10

20

30

40

50

## (A. 予防法)

1つの局面において、本発明は、20750発現もしくは20750活性を調節する因子（例えば、細胞増殖（例えば、腫瘍細胞増殖）の調節）を被験体に投与することによって、その被験体において細胞増殖障害を予防するための方法を提供する。細胞増殖障害の危険性がある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはその組合せによつて、同定され得る。予防薬の投与は、異常な20750の発現または活性が特徴的な症状の徵候の前に生じ得、その結果、細胞増殖障害が、予防されるか、またはその進行において遅延される。20750異常の型に依存して、例えば、20750、20750のアゴニスト剤または20750のアンタゴニスト剤が、被験体の処置のために使用され得る。適切な因子は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基いて決定され得る。

## 【0116】

## (B. 治療方法)

本発明の別の局面は、細胞増殖障害に罹患した被験体を処置するための方法に関する。これらの方法は、20750の発現または活性を調節する薬剤（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイにより同定される薬剤）、またはこのような薬剤の組み合わせを、被験体に投与することを包含する。別の実施形態では、この方法は、低下した、異常な、または望ましくない、20750の発現または活性を補償するための治療として、20750のタンパク質または核酸分子を、被験体に投与することを包含する。

## 【0117】

20750活性の調節（例えば、阻害）は、20750が異常にアップレギュレートされている状況、および／または低減した20750の活性が、有益な効果（例えば、-カーテニン分解、細胞の増殖、移動および増殖の阻害）を有し、それによつて、被験体における細胞増殖障害（例えば、結腸癌、肺癌、または乳癌のような癌）を改良すると考えられる状況において望ましい。

## 【0118】

20750の活性を調節する因子は、このような投与に適切な薬学的組成物を用いて、被験体に投与され得る。このような組成物は、代表的には、因子（例えば、核酸分子、タンパク質、または抗体）および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合性の、任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌性および抗真菌性の薬剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該分野で周知である。活性な化合物と非適合性の任意の従来の媒体または薬剤の範囲を除いて、このような媒体の本発明の組成物における使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、この組成物に組み込まれ得る。

## 【0119】

本発明の治療方法において用いられる薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性となるように処方される。投与経路の例としては、非経口的投与（例えば、静脈内投与）、皮内投与、皮下投与、経口投与（例えば、吸入）、経皮投与（局所的投与）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注射のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝剤（例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩）；および張性を調整するための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）を用いて調整され得る。非経口的調製物は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数用量のバイアルに封入され得る。

## 【0120】

10

20

30

40

50

注射用途に適切な薬学的組成物は、滅菌注射溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌粉末を含む。静脈内投与については、適切なキャリアには、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF; Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) が挙げられる。全ての場合において、この組成物は、滅菌されなければならず、そして容易なシリング能力 (syringability) が存在する程度にまで流動的にされるべきである。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。このキャリアは、溶媒または分散媒体（例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）を含む）、ならびにそれらの安定な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合に必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、および塩化ナトリウム）をこの組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の延長した吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）をこの組成物中に含むことによって、もたらされ得る。

10

20

30

## 【0121】

滅菌注射用溶液は、20750活性を調節する因子（例えば、20750タンパク質のフラグメント、あるいは抗20750抗体）を、上記で列挙した成分の1以上の組合せを用いて、必要とされる量で、適切な溶媒中に取り込ませ、必要に応じて、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒体および上記に列挙された成分のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクリル中に取り込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、減圧乾燥および凍結乾燥であり、これらは、予め滅菌濾過された溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる。

40

## 【0122】

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤に加圧され得る。経口治療投与の目的で、この活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、そして錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての使用のための流体キャリアを使用して調製され得、ここで、流体キャリア中の化合物は、経口的に適用され、そしてスウィッシュ (swish) されて、吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュvant材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のいずれかまたは同様の性質の化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターク）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはStearotes）；グライダント（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは矯味矯臭剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

50

## 【0123】

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

## 【0124】

全身投与もまた、経粘膜手段または経皮手段によってなされ得る。経粘膜投与または経皮投与のために、透過されるべき障壁に対して適切な透過剤が、処方物中に使用される。そ

50

のような透過剤は、当該分野で一般的に公知であり、そのような透過剤としては、例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、経鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与のために、活性化合物は、当該分野で一般的に公知であるような、軟膏、軟膏剤、ゲル、またはクリームへと処方される。

【0125】

20750活性を調節する薬剤もまた、（例えば、カカオ脂および他のグリセリドのような、従来の坐剤基剤を用いて）坐剤の形態で調製され得るか、または経直腸送達のために保持浣腸の形態で調製され得る。

【0126】

1つの実施形態において、20750活性を調節する薬剤は、その化合物が身体から迅速に排出されるのを防ぐキャリアを用いて調製される（例えば、移植植物および微小カプセル化送達システムを含む、制御放出処方物）。生分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。そのような処方物の調製方法は、当業者にとって明らかである。それらの物質はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する、感染細胞を標的化したリポソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0127】

投与の容易さおよび投与量の均一さのために、単位投与形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位投与形態とは、処置される被験体に対する単位投与量としての適切な、物理的に別個の単位を指す；各単位は、必要な薬学的キャリアに付随した状態で、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の単位投薬形態についての説明は、20750活性を調節する薬剤の独特的特徴、ならびに達成されるべき特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためにそのような薬剤を配合する分野に固有の制限により決定され、直接これらに依存する。

【0128】

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

【0129】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトにおける使用のために一定範囲の投与量を処方する際に使用され得る。そのような20750調節薬剤の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど伴わないかまたは全く伴わない、ED<sub>50</sub>を含む一定範囲の循環濃度内に存在する。その投与量は、使用される投与形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。本発明の治療方法において使用されるどの薬剤についても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイからまず推定され得る。細胞培養において決定されるようなIC<sub>50</sub>（すなわち、症状の最大阻害半分を達成する試験化合物濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて処方され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために、使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

10

20

30

40

50

## 【0130】

本明細書中で規定される場合、タンパク質またはポリペプチドの治療上有効な量（すなわち、有効投与量）は、約0.001～30mg/kg体重、好ましくは、約0.01～25mg/kg体重、より好ましくは、約0.1～20mg/kg体重、およびなおより好ましくは、約1～10mg/kg体重、2～9mg/kg体重、3～8mg/kg体重、4～7mg/kg体重、または5～6mg/kg体重の範囲である。特定の要因が、被験体を有効に処置するために必要な投与量に影響し得ることを当業者は認識し、そのような要因としては、疾患もしくは障害の重篤度、以前の処置、被験体の全身の健康および/または年齢、ならびに存在する他の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療上有効な量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体を用いる被験体の処置は、単回処置を包含し得、好ましくは、一連の処置を包含し得る。

10

## 【0131】

好ましい例において、被験体は、約0.1mg/kg体重～20mg/kg体重の間の範囲にある抗体、タンパク質、またはポリペプチドを用いて、1週間に1回、約1～10週間の間、好ましくは2～8週間の間、より好ましくは約3～7週間の間、なおより好ましくは約4週間、5週間、または6週間の間、処置される。処置に使用される抗体、タンパク質、またはポリペプチドの有効投与量は、特定の処置経過にわたって増加または減少し得ることもまた、認識される。投与量の変化は、本明細書中に記載される診断アッセイの結果から生じ得、そしてその結果から明らかになり得る。

20

## 【0132】

本発明は、発現または活性を調節する薬剤を包含する。薬剤は、例えば、低分子であり得る。例えば、そのような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000グラム/mol未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000グラム/mol未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約1,000グラム/mol未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。低分子薬剤の適切な用量は、当業者である医師、獣医師、または研究者の知識内にある多数の要因に依存することが理解される。この低分子の用量は、例えば、処置される被験体またはサンプルの主体性、サイズおよび状態に依存して変化し、さらに、該当する場合は、その組成物が投与される経路、ならびに本発明の核酸もしくはポリペプチドに対してその低分子が有することを実施者が望む効果に依存して変化する。例示的な用量としては、被験体またはサンプルの重量1kgあたり、ミリグラム量またはマイクログラム量の低分子（例えば、約1μg/kg～約500mg/kg、約100μg/kg～約5mg/kg、または約1μg/kg～約50μg/kg）が挙げられる。低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性に関するその低分子の能力に依存することが、さらに理解される。そのような適切な用量は、本明細書中に記載されるアッセイを使用して決定され得る。これらの低分子のうちの1つ以上が、本発明のポリペプチドまたは核酸の発現もしくは活性を調節するために動物（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医師、または研究者は、例えば、最初に比較的低用量を処方し、その後、適切な応答が得られるまでその用量を増加させ得る。さらに、特定の任意の動物被験体についての特定の用量レベルは、種々の要因（使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、被験体の体重、被験体の全身の健康、被験体の性別、および被験体の食餌、投与時期、投与経路、排出速度、任意の薬物組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む）に依存することが、理解される。

30

40

## 【0133】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、治療部分（例えば、サイトトキシン）、治療剤、または放射性金属イオンに結合体化され得る。サイトトキシンまたは細胞傷害性薬

50

剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を包含する。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジョン、ミトキサンtron、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロパロノール、およびピューロマイシン、ならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン（decarbazine））、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイマイシンC、およびcis-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（前名ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（前名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0134】

本発明の結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、その薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、その薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、トキシン（例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリアトキシン）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、-インターフェロン、-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子）；または生物学的応答改変因子（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、あるいは他の増殖因子）が挙げられ得る。

## 【0135】

そのような治療部分を抗体に結合体化するための技術は、周知である。例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら編、pp. 243~56 (Alan R. Liss, Inc., 1985) のArnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotherapy Of Drugs In Cancer Therapy」；Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinsonら編 pp. 623~53 (Marcel Dekker, Inc., 1987) のHellstromら「Antibodies For Drug Delivery」；Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら編, pp. 475~506 (1985) のThorpe, 「Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review」；Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら編、pp. 303~16 (Academic Press 1985) の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」；ならびにThorpeら「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」, Immunol. Rev. 62: 119~58 (1982) を参照のこと

10

20

30

40

50

。あるいは、抗体は、Segalによって米国特許第4,676,980号中に記載されるように、抗体ヘテロ結合体を形成するために二次抗体と結合体化され得る。

#### 【0136】

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

#### 【0137】

(C. 薬理ゲノム学(pharmacogenomics))

本発明の治療法と組み合わせて、薬理ゲノム学(すなわち、被験体の遺伝子型と、外来化合物または外来薬物に対するその被験体の応答との間の関連性の研究)が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血液濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗をもたらし得る。従って、医師または臨床医は、20750活性を調節する薬剤を投与するか否か、ならびに20750活性を調節する薬剤を用いる処置の投与量および/もしくは治療レジメンを変更するか否かを決定する際に、適切な薬理ゲノム学研究において得られる知識を適用することを考慮し得る。

#### 【0138】

薬理ゲノム学は、罹患した個人における変化した薬物の性質および異常な作用に起因する、薬物に対する応答における臨床学的に有意な遺伝的変動を取り扱う。例えば、Eichelbaum, M. ら、(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23(10~11):983~985およびLinder, M. W. ら、(1997) Clin. Chem. 43(2):254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学的条件は、区別され得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する(変化した薬物作用)単一因子として伝達したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する(変化した薬物代謝)単一因子として伝達した。これらの薬理ゲノム学的条件は、稀な遺伝子欠損または天然に存在する多型のいずれかとして、存在し得る。例えば、グルコース-6-リン酸アミノペプチダーゼ欠損(G6PD)は、一般的な遺伝性酵素病であり、ここで、主な臨床学的合併症は、酸化剤薬物(抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン)の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

#### 【0139】

「ゲノムワイド相関解析(genome-wide association)」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための1つの薬理ゲノム学的アプローチは、すでに知られている遺伝子関連マーカー(例えば、「二座対立遺伝子」マーカーマップ(これは、ヒトゲノム上の60,000~100,000の多型部位または変動部位からなり、その部位の各々は、2つの改変体を有する))からなるヒトゲノムの高分離度マップに、主に依存する。このような高分離度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、フェーズII/フェーズIIIの薬物試験に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高分離度マップは、ヒトゲノムにおいて、数千万個の公知の単一ヌクレオチド多型(SNP)の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」とは、DNAストレッチにおいて、单一のヌクレオチド塩基において生じる一般的な変化である。例えば、SNPは、1000塩基のDNAごとに1回生じ得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連していないかもしれない。こ

10

20

30

40

50

のような S N P の発生に基づく遺伝地図を考慮すると、個体は、個々のゲノムにおける特定の S N P パターンに依存して、複数の遺伝カテゴリーへと分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、遺伝的に類似する個体の間で共通であり得る形質を考慮して、そのような遺伝的に類似する個体の群に合わせて変更され得る。

#### 【 0 1 4 0 】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物標的をコードする遺伝子が既知である場合（例えば、本発明の 20750 タンパク質）、その遺伝子のすべての一般的な改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する 1 つの遺伝子バージョンを有することが特定の薬物応答に関連するか否かが決定され得る。  
10

#### 【 0 1 4 1 】

例示的実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続時間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N - アセチルトランスフェラーゼ 2 ( N A T 2 ) およびシトクロム P 450 酵素である C Y P 2 D 6 および C Y P 2 C 19 ）の遺伝子多型の発見は、標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に、予測される薬物効果を得ることも過大な薬物応答および重篤な毒性を示すこともない患者が存在する理由に関する説明を提供した。これらの多型は、その集団中で 2 つの表現型（代謝が速い者（ E M ）および代謝が遅い者（ P M ））の状態で発現される。 P M の普及率は、種々の集団間で異なる。例えば、 C Y P 2 D 6 をコードする遺伝子は、非常に多型性であり、いくつかの変異が、 P M において同定されており、そのすべてが、機能的 C Y P 2 D 6 の不在をもたらす。 C Y P 2 D 6 および C Y P 2 C 19 の代謝速度が遅い者は、標準的用量を受けたときに、過大な薬物応答および副作用を非常に頻繁に経験する。代謝物が活性な治療部分である場合、 P M は、 C Y P 2 D 6 が形成した代謝物であるモルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果について示されるように、治療応答を示さない。その他の極端な者は、標準的用量に対して応答しない、いわゆる代謝が著しく速い者である。最近、著しく速い代謝の分子的基礎が、 C Y P 2 D 6 遺伝子増幅に起因することが同定された。  
20

#### 【 0 1 4 2 】

あるいは、「遺伝子発現プロファイリング」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。例えば、薬物（例えば、本発明の 20750 分子または 20750 モジュレーター）を投薬された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が作動するかどうかの指標を与え得る。  
30

#### 【 0 1 4 3 】

上記薬理ゲノム学的アプローチのうちの 1 つより多くから得られる情報が、被験体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定するために使用され得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、それによって、 20750 活性を調節する薬剤を用いて細胞増殖障害に罹患している被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強し得る。

#### 【 0 1 4 4 】

( I V . 本発明の方法において使用される、組換え発現ベクターおよび宿主細胞 )  
40  
本発明の方法（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイ）は、 20750 タンパク質（またはその一部）をコードする核酸を含むベクター（好ましくは発現ベクター）の使用を包含する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、連結された別の核酸を輸送し得る、核酸分子を指す。 1 つの型のベクターは、「プラスミド」であり、「プラスミド」とは、さらなる D N A セグメントが連結され得る、環状の二本鎖 D N A の輪（ l o o p ）を指す。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、そのベクターにおいて、さらなる D N A セグメントが、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、導入される宿主細胞中で自律複製可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中に導入された際に、宿主細胞のゲノム中に 50

組み込まれ、それによって、その宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指向し得る。そのようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」とは、互換可能に使用され得る。なぜなら、プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用される形態であるからである。しかし、本発明は、等価な機能を提供する、そのような他の形態の発現ベクター（例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス））を包含することが意図される。

#### 【0145】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に適切な形態で発明の核酸を含む。このことは、その組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列（発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される）を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロでの転写／翻訳系において、またはそのベクターが宿主細胞中に導入される場合は、その宿主細胞において）そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goedde (1990) Methods Enzymol. 185: 3~7に記載される。調節配列とは、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞においてのみそのヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を包含する。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者により認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、それにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、20750タンパク質、20750タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を產生し得る。

#### 【0146】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における20750タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、20750タンパク質は、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goedde (1990) 前出においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写および翻訳され得る。

#### 【0147】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを使用して、E. coliにおいて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、ベクター中にコードされるタンパク質に、通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に、多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的を果たす：1) 組換えタンパク質の発現を増大させること；2) 組換えタンパク質の可溶性を増大させること；および3) アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位は、融合部分と組換えタンパク質の接合部に導入され、融合タンパク質の精製に統いて、組換えタンパク質を融合部分から分離することが可能になる。このような酵素、およびそれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、標的組換えタンパク

10

20

30

40

50

質に融合させる、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. および Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) および pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) が挙げられる。

【0148】

精製融合タンパク質は、20750活性アッセイ（例えば、以下に詳細に記載される直接的アッセイまたは競合アッセイ）において、または20750タンパク質に特異的な抗体を生成するために利用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される20750融合タンパク質は、骨髄細胞に感染させるために利用され得る。続いて、この骨髄細胞は、照射されたレシピエントに移植される。次いで、被験体レシピエントの病態は、十分な時間（例えば、6週間）が経過した後に試験される。

【0149】

別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329: 840) および pMT2PC (Kaufmannら (1987) EMBO J. 6: 187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルス調節エレメントにより提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方について適切な他の発現系については、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0150】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型においてこの核酸の発現を優先的に指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントがこの核酸を発現させるために使用される）。

【0151】

本発明の方法は、本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクター（このDNA分子は、この発現ベクターにアンチセンス方向にてクローニングされる）をさらに使用し得る。すなわち、このDNA分子は、20750mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の（このDNA分子の転写による）発現を可能にする様式にて、調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的発現を指向する、アンチセンス方向にクローニングされる核酸に作動可能に連結される調節配列（例えば、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサー）が選択され得るか、またはアンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。このアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であり得、この中でアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で生成され、その活性は、ベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraub, H. ら, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986を参照のこと。

【0152】

本発明の別の局面は、本発明の20750核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の20750核酸分子または宿主細胞のゲノムの特定の部位への相同組み換えを可能にする配列を含む20750核酸分子）が導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語が、

10

20

30

40

50

特定の被験体細胞のみならず、このような細胞の子孫または潜在的な子孫もまたいうことが理解される。特定の改変が、変異または環境的影響のいずれかに起因して、連續した世代において生じ得るので、このような子孫は、実際に、親細胞と同じでなくてもよいが、なお本明細書中で使用される用語の範囲内に含まれる。

#### 【0153】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、20750タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

#### 【0154】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して、原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、宿主細胞に外因性核酸（例えば、DNA）を導入するための種々の当該分野で認識される技術（リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクチン、またはエレクトロポレーションを含む）をいうことが意図される。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする適切な方法は、Sambrookら、(Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)、および他の実験マニュアルにおいて見出され得る。

#### 【0155】

本発明の方法において使用される宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）は、20750タンパク質を産生する（すなわち、発現する）ために用いられ得る。従って、本発明は、さらに本発明の宿主細胞を用いて20750タンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞（20750タンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を、20750タンパク質が産生されるような適切な培地で培養する工程を包含する。別の実施形態では、本方法は、培地または宿主細胞から20750タンパク質を単離する工程をさらに包含する。

#### 【0156】

（V. 本発明の方法において使用される単離された核酸分子）

単離されたヒト20750のcDNAのコード配列およびヒト20750ポリペプチドの推定アミノ酸配列を、それぞれ配列番号1および2に示す。

#### 【0157】

本発明の方法は、20750タンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、ならびに20750をコードする核酸分子（例えば、20750mRNA）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸フラグメント、および20750核酸分子を増幅または変異するためのPCRプライマーとしての使用のためのフラグメントの使用を、包含する。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびにスクレオチドアナログを使用して生成されるDNAアナログまたはRNAアナログを含むことが意図される。この核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

#### 【0158】

1つの実施形態では、本発明の20750分子は、少なくとも1つの「膜貫通ドメイン」を含む。本明細書中で使用される場合、用語「膜貫通ドメイン」は、原形質膜にまたがる約20~45アミノ酸残基長のアミノ酸配列を包含する。より好ましくは、膜貫通ドメインは、少なくとも、約20、約25、約30、約35、約40、または約45アミノ酸残基を含み、そして原形質膜にまたがる。膜貫通ドメインは、疎水性残基がリッチであり、

10

20

30

40

50

そして代表的に、ヘリックス構造を有する。好ましい実施形態では、膜貫通ドメインのうちの少なくとも、50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれより多くのアミノ酸が、疎水性（例えば、ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、フェニルアラニン、プロリンまたはメチオニン）である。膜貫通ドメインは、例えば、Zago et al. W.N.ら(1996) Annual Rev. Neurosci. 19: 235-263（この内容は、本明細書中に参考として援用される）に記載される。ヒト20750ポリペプチド（配列番号2）のアミノ酸残基214～231は、膜貫通ドメインを含む。

## 【0159】

20750タンパク質における膜貫通ドメインの存在を同定するため、そして目的のタンパク質が特定のプロファイルを有することを決定するために、このタンパク質のアミノ酸配列は、MEMSAT分析に供され得る。配列番号2と示される20750タンパク質のMEMSAT分析は、ヒト20750のアミノ酸配列（配列番号2）における残基約130～147での膜貫通ドメイン（2.9というスコアを有する）の同定をもたらす。

## 【0160】

別の実施形態では、本発明の20750分子は、少なくとも1つの「プロテインキナーゼドメイン」を包含する。本明細書で使用される場合、用語「プロテインキナーゼドメイン」は、少なくとも約150～約350アミノ酸残基を有しかつ真核生物プロテインキナーゼドメインの隠れマルコフモデル（HMM）（例えば、PFAM登録番号PF00069）に対して比較した場合の少なくとも150のビットスコアを有する、タンパク質ドメインを含む。好ましくは、真核生物プロテインキナーゼドメインは、約125～約325、約150～約300、約190～約225またはより好ましくは約200アミノ酸残基のアミノ酸配列を有しかつ少なくとも150、210、250またはより好ましくは275.7のビットスコアを有する、タンパク質を含む。

## 【0161】

本発明の方法において用いられる核酸分子（例えば、配列番号1のヌクレオチド配列またはその一部分を有する核酸分子）は、標準的分子生物学的技術および本明細書中に提供される配列情報を用いて単離され得る。配列番号1の核酸配列の全体または一部分をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、20750核酸分子は、標準的ハイブリダイゼーション技術および標準的クローニング技術を用いて単離され得る（例えば、Sambrook, J., Fritsch, E.F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載される通り）。

さらに、配列番号1の全体または一部を含む核酸分子を、配列番号1の配列に基づいて設計した合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、単離し得る。

## 【0162】

本発明の方法において使用される核酸を、標準的なPCR增幅技術に従って、テンプレートとしてのcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅し得る。さらに、20750ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを、標準的な合成技術（例えば、自動化DNA合成機を使用すること）によって、調製し得る。

## 【0163】

好ましい実施形態では、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の相補体、またはこれらのヌクレオチド配列のいずれかの一部分を含む。配列番号1に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子とは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的であって、その結果、配列番号1に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズ

10

20

30

30

40

50

し得、それによって安定な二重鎖を形成する、核酸分子である。

【0164】

なお別の好ましい実施形態では、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の全長、またはこの核酸配列のいずれかの一部分に、少なくとも約55%、約59%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれより高度に同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0165】

さらに、本発明の方法において使用される核酸分子は、配列番号1の核酸配列の一部分（例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメント、または20750タンパク質の一部分（例えば、20750タンパク質の生物学的に活性な部分）をコードするフラグメント）のみを含み得る。プローブ／プライマーは、代表的に、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、代表的に、配列番号1のセンス配列もしくは配列番号1のアンチセンス配列、または配列番号1の天然に存在する対立遺伝子の改变体もしくは変異体のうちの、少なくとも、約12または15、好ましくは約20または約25個、より好ましくは約30個、約35個、約40個、約45個、約50個、約55個、約60個、約65個または約75個連続したヌクレオチドに、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。1つの実施形態では、本発明の方法において使用される核酸分子は、100より大きい、100～200、200～300、300～400、400～500、500～600、600～700、700～800、800～900、900～1000、1000～1100、1100～1200、1200～1300、1300～1400、1400～1500またはさらに長いヌクレオチド長であって、かつストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

【0166】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに有意に同一または相同であるヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズされたままである状態でハイブリダイゼーションおよび洗浄するための条件を記載することを意図する。好ましくは、この条件は、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、なにより好ましくは少なくとも約85%または90%互いに同一な配列が、互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。このようなストリンジエントな条件は、当業者に公知であり、そして Current Protocols in Molecular Biology , Ausubelら編、John Wiley & Sons , Inc . (1995) , 第2節、第4節および第6節に見出され得る。さらなるストリンジエントな条件は、Molecular Cloning : A Laboratory Manual , Sambrookら、Cold Spring Harbor Press , Cold Spring Harbor , NY (1989) 、第7章、第9章および第11章に見出され得る。好ましい、ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約65～70での、4×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) 中でのハイブリダイゼーション（または約4.2～5.0での、4×SSC + 5.0% ホルムアミド中でハイブリダイゼーション）、次いで約6.5～7.0での、1×SSCで1回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約6.5～約7.0にて1×SSCでのハイブリダイゼーション（または約4.2～5.0での、1×SSC + 5.0% ホルムアミド中でハイブリダイゼーション）、次いで約6.5～7.0にて0.3×SSCでの1回以上の洗浄が挙げられる。低下したストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例としては、約5.0～6.0での、4×SSC中でハイブリダイゼーション（または代わりに約4.0～4.5での、6×SSC + 5.0% ホルムアミド中でハイブリダイゼーション）、次いで約5.0～6.0での、2×SSCで1回以上の洗浄が挙げられる。上記の値の中間の範囲（例えば、6.5～7.0または4.2～5.0）もまた

、本発明に含まれることが意図される。SSPE ( $1 \times$  SSPE は、 $0.15\text{M}$  NaCl、 $10\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  および  $1.25\text{mM}$  EDTA、pH 7.4 である) は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液中でSSC ( $1 \times$  SSC は、 $0.15\text{M}$  NaCl および  $15\text{mM}$  クエン酸ナトリウムである) の代わりをし得る; 洗浄は、各ハイブリダイゼーションが完了した後で、15分間実行される。50塩基対長未満であることが予測されるハイブリッドについてのハイブリダイゼーション温度は、このハイブリッドの融解温度 ( $T_m$ ) より  $5 \sim 10$  低くあるべきであり、ここで  $T_m$  が以下の式に従って決定される。 $18$  塩基対長未満であるハイブリッドについて、 $T_m$  ( ) =  $2(A + T$  塩基の数) +  $4(G + C$  塩基の数)。 $18$  塩基対長と  $49$  塩基対長の間であるハイブリッドについて、 $T_m$  ( ) =  $81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - (600/N)$  であり、ここで、N はこのハイブリッド中の塩基数であり、そして  $[\text{Na}^+]$  は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である ( $1 \times$  SSC についての  $[\text{Na}^+] = 0.165\text{M}$ )。膜(例えば、ニトロセルロース膜、またはナイロン膜)への核酸分子の非特異的ハイブリダイゼーションを減少させるために、さらなる試薬が、ハイブリダイゼーション緩衝液および/または洗浄緩衝液に添加され得ることもまた当業者によってまた認識され、この試薬としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ブロッキング剤(例えば、BSA、もしくはサケまたはニシンの精子のキヤリアDNA)、界面活性剤(例えば、SDS)、キレート剤(例えば、EDTA)、Ficoll、PVPなど。ナイロン膜が使用される場合、特に、さらなる好ましいストリージェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、 $65$  での、 $0.25 \sim 0.5\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $7\%$  SDS 中でハイブリダイゼーション、次いで  $65$  での、 $0.02\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $1\%$  SDS(または代替的に  $0.2 \times$  SSC、 $1\%$  SDS)で1回以上の洗浄である(例えば、Church および Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995 を参照のこと)。

## 【0167】

好ましい実施形態において、プローブは、プローブに結合される標識基をさらに含む(例えば、標識基は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子であり得る)。このようなプローブは、20750タンパク質を誤発現する(misexpress)細胞または組織を同定するための診断的試験キットの一部として使用され得る(例えば、被験体由来の細胞サンプル中の20750コード核酸のレベルを測定すること、例えば、20750mRNAレベルを検出するか、またはゲノム20750遺伝子が変異されているか欠失されているか否かを測定することによって)。

## 【0168】

本発明の方法は、遺伝暗号の縮重に起因して、配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは異なり従って、配列番号1に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じ20750タンパク質をコードする核酸分子の使用をさらに含む。別の実施形態において、本発明の方法に含まれる単離された核酸分子は、配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

## 【0169】

本発明の方法は、ヒト20750の対立遺伝子改变体(例えば、機能的対立遺伝子改变体および非機能的対立遺伝子改变体)の使用をさらに含む。機能的対立遺伝子改变体は、ヒト20750タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改变体であって、20750活性を維持するアミノ酸配列改变体である。機能的対立遺伝子改变体は、代表的に、配列番号2の1つ以上のアミノ酸の保存的置換、またはそのタンパク質の非必須領域における非必須残基の置換、欠失、もしくは挿入のみを含む。非機能的対立遺伝子改变体は、ヒト20750タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改变体であって、20750活性を有さないアミノ酸配列改变体である。非機能的対立遺伝子改变体は、代表的には、配列番号2のアミノ酸配列の非保存的な置換、欠失、もしくは挿入または未成熟短縮化(premature truncation)、あるいはこのタンパク質の必須残基または必須領域

10

20

30

40

50

の置換、挿入、または欠失を含む。

【0170】

本発明の方法は、ヒト20750タンパク質の非ヒトオルソログをさらに使用し得る。ヒト20750タンパク質のオルソログは、非ヒト生物から単離され、そして同じ20750活性を有するタンパク質である。

【0171】

本発明の方法は、配列番号1のヌクレオチド配列またはそれらの一部を含む核酸分子であって、変異が導入されている核酸分子の使用をさらに包含する。変異は、「非必須」アミノ酸残基または「必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導き得る。「非必須」アミノ酸残基とは、その生物学的活性を変化することなく20750の野生型配列（例えば、配列番号2の配列）から変化され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性のために必要とされる。例えば、本発明の20750タンパク質およびプロテインキナーゼファミリーの他のメンバーの間で保存されたアミノ酸残基は、変化を受容する可能性は低い。

【0172】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）により配列番号1に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1つ以上の予想される非必須アミノ酸残基でなされる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該分野において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、-分枝鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、好ましくは、20750タンパク質において予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって、20750のコード配列の全てまたは一部に沿って、ランダムに導入され得、そして得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、20750の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号1の変異誘発の後、コードされたタンパク質が、組換え発現され得、そしてそのタンパク質の活性が、本明細書中に記載されたアッセイを用いて決定され得る。

【0173】

本発明の別の局面は、配列番号1のヌクレオチド配列に対するアンチセンスである単離された核酸分子の使用に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、全長20750コード鎖または、それらの一部のみに相補的であり得る。1つの実施形態において、アンチセンス核酸分子は、20750をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態において、このアンチセンス核酸分子は、20750をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対するアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する5'配列および3'配列であって、アミノ酸に翻訳されない配列をいう（5'および3'の非翻訳領域ともいう）。

【0174】

本明細書中に開示される20750をコードするコード鎖配列を考慮して、本発明のアン

10

20

30

40

50

チセンス核酸は、Watson および Crick の塩基対形成の法則に従って、設計され得る。アンチセンス核酸分子は、20750mRNA の全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、20750mRNA のコード領域または非コード領域の一部のみに對してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、20750mRNA の翻訳開始部位の周辺領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学的合成および酵素的連結反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増大するように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二重鎖の物理的安定性を増大するように設計された、種々に改変されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る。例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる：5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D - ガラクトシリルキューオシン、イノシン、N6 - イソベンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、-D - マンノシリルキューオシン、5' - メトキカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソベンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、ワイプトキソシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w および 2, 6 - ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを使用して、生物学的に生成され得る（すなわち、挿入された核酸から転写される RNA は、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向の RNA であり、以下の下位の節においてさらに記載される）。

### 【0175】

本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、代表的に、被験体に投与されるかまたはインサイチュで産生され、その結果、これらは、20750タンパク質をコードする細胞性 mRNA および / またはゲノム DNA にハイブリダイズするかまたは結合して、それによって、例えば、転写および / または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によって、または、例えば、DNA 二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与し得る。例えば、全身投与に関して、アンチセンス分子は、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力な pol I I プロモーターまたは pol I I I プロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が、好み 40

10

20

30

40

50

い。

【0176】

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

10

【0177】

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらのリボザイムが相補的領域を有する、一本鎖核酸(例えば、mRNA)を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従つて、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HaselhoffおよびGerlach(1988) Nature 334: 585-591に記載される))は、20750 mRNA転写物を触媒的に切断するために使用されて、それによって、20750 mRNAの翻訳を阻害し得る。20750コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示される20750 cDNA(すなわち、配列番号1)のヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が20750コードmRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に対して相補的であるように構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、20750 mRNAを使用して、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartel, D. およびSzostak, J. W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照のこと。

20

【0178】

あるいは、20750遺伝子の発現は、標的細胞中で20750遺伝子の転写を防止する三重ヘリックス構造を形成するために、20750の調節領域(例えば、20750のプロモーターまたはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害され得る。一般に、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. ら(1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; およびMaher, L. J. (1992) Bioassays 14(12): 807-15を参照のこと。

30

【0179】

なお別の実施形態において、本発明の方法において使用される20750核酸分子は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る(Hyrup B. ら(1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」すなわち「PNA」は、核酸模倣物(例えば、DNA模倣物)をいい、ここで、デオキシリボースリン酸骨格は、偽ペプチド骨格によって置換され、そして4種の天然の核酸塩基だけが維持される。PNAの天然の骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAへの特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して、Hyrup B. ら(1996)前出；Perry-O'Keefeら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675に記載されるように実施され得る。

40

【0180】

50

20750核酸分子のPNAは、本明細書中に記載される治療適用および診断適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導するか、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス因子またはアンチ遺伝子(*antigene*)因子として使用され得る。20750核酸分子のPNAはまた、遺伝子中の単一塩基対の変異の分析において(例えば、PNA指向性のPCRクランピングによって);他の酵素と組み合わせて使用する場合には、「人工制限酵素」として(例えば、S1ヌクレアーゼ(Hyruup B.ら(1996)前出))<sup>10</sup>;またはDNA配列決定もしくはハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして(Hyruup B.ら(1996)前出; Perry-O'Keefeら(1996)前出)、使用され得る。

### 【0181】

別の実施形態において、20750のPNAは、(例えば、PNAの安定性または細胞取り込みを増強するために)、PNAに親油性もしくは他のヘルパー基を結合させることによってか、PNA-DNAキメラの形成によってか、またはリボソームもしくは当該分野で公知の他の薬物送達技術の使用によって、改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせ得る20750核酸分子のPNA-DNAキメラが、生成され得る。このようなキメラは、DNA認識酵素(例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ)に、DNA部分と相互作用させ、一方、PNA部分は、高い結合親和性および結合特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合の数および方向に関して選択される、適切な長さのリンカーを使用して、連結され得る(Hyruup B.ら(1996)前出)<sup>20</sup>。PNA-DNAキメラの合成は、Hyruup B.ら(1996)前出ならびにFinn P.J.ら(1996)Nucleic Acids Res. 24(17):3357-63に記載されるように実施され得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホロアミダイトカッティング化学および改変ヌクレオシドアナログを使用して、固体支持体上で合成され得る。例えば、5'--(4-メトキシリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホルアミダイトが、PNAとDNAの5'末端との間として使用され得る(Mag, M.ら(1989)Nucleic Acid Res. 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーは、段階的な様式でカッティングされて、5'PNAセグメントおよび3'DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する(Finn P.J.ら(1996)前出)<sup>30</sup>。あるいは、キメラ分子は、5'DNAセグメントおよび3'PNAセグメントを用いて合成され得る(Petersen, K.H.ら(1975)Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:1119-11124)。

### 【0182】

他の実施形態において、本発明の方法において使用されるオリゴヌクレオチドは、他の付随的な基(例えば、(例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため)ペプチド、または細胞膜(例えば、Letsingerら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitreら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648-652; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと)もしくは血液-脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと)を横切る輸送を促進する因子を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションが引き金を引く切断因子(例えば、Krolら(1988)Bio-techniques 6:958-976を参照のこと)またはインターフェース因子を用いて改変され得る(例えば、Zon(1988)Pharm. Res. 5:539-549を参照のこと)。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションが引き金を引く架橋剤、輸送因子またはハイブリダイゼーションが引き金を引く切断因子)に結合体化され得る。

### 【0183】

(V) 本発明の単離された20750タンパク質および抗20750抗体)

10

20

30

40

50

本発明の方法は、単離された 20750 タンパク質およびこれらの生物学的に活性な部分、ならびに抗 20750 抗体を惹起するための免疫原として使用されるのに適切なポリペプチドフラグメントの使用を包含する。1つの実施形態において、ネイティブの 20750 タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する、適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、20750 タンパク質は、組換え DNA 技術によって生成される。組換え発現の代わりに、20750 のタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して、化学的に合成され得る。

#### 【 0184 】

本明細書中で使用する場合、20750 タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、20 10 750 活性を有する、20750 タンパク質のフラグメントを含む。20750 タンパク質の生物学的に活性な一部分としては、全長の 20750 タンパク質より少ないアミノ酸を含み、かつ 20750 タンパク質の少なくとも 1 つの活性を示す、20750 タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列）に十分に同一であるか、あるいはこれらに由来するアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。代表的には、生物学的に活性な部分は、20750 タンパク質の少なくとも 1 つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。20750 タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、25 、50、75、100、125、150、175、200、215、250、300、350、400 またはそれより長いアミノ酸長である、ポリペプチドであり得る。2075 0 タンパク質の生物学的に活性な部分は、20750 活性を調節する薬剤を開発するため 20 の標的として使用され得る。

#### 【 0185 】

好ましい実施形態では、本発明の方法において使用される 20750 タンパク質は、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、20750 タンパク質は、配列番号 2 に対して実質的に同一であり、そして配列番号 2 のタンパク質の機能的活性を保持するが、上記第 V 節において詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変または変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、本発明の方法において使用される 20750 タンパク質は、配列番号 2 に対して少なくとも約 50%、55%、59%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% またはそれより高度に同一なアミノ酸配列を含むタンパク質である。30

#### 【 0186 】

2 つのアミノ酸配列、または 2 つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップは、最適な整列のために、第 1 および第 2 のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非同一配列は、比較目的では無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の少なくとも 30%、好ましくは少なくとも 40%、より好ましくは少なくとも 50%、なにより好ましくは少なくとも 60%、およびさらにより好ましくは、少なくとも 70%、80% または 90% の長さである（例えば、439 アミノ酸残基を有する、配列番号 2 の 20750 アミノ酸配列に第二の配列を整列させる場合、少なくとも 75、好ましくは少なくとも 150、より好ましくは少なくとも 225、なにより好ましくは少なくとも 300 およびなにより好ましくは少なくとも 400 またはそれより多くのアミノ酸残基が整列される）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが、比較される。第 1 の配列における位置が、第 2 の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、これらの分子は、その位置で同一である（本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「同一性」は、アミノ酸または核酸の「相同性」と等しい）。2 つの配列間のパーセント同一性は、ギャップの数を考慮した、それらの配列により共有される同一の位置の数、および 2 つの配列の最適な整列のために導入される必要のある各ギャップの長さの関数である。40 50

## 【0187】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Groupからオンラインで入手可能)中のGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))のアルゴリズムを用い、Blosum62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト16、14、12、10、8、6、または4およびレングスウェイト(length weight)1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(Genetics Computer Groupからオンラインで入手可能)中のGAPプログラムを用い、NWGapDNA.CMPマトリクスならびにギャップウェイト40、50、60、70、または80およびレングスウェイト1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。別の実施形態では、2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0または2.0U)に組みこまれたE.Meyers、およびW.Miller(Comput.Appl.Biosci.4:11-17(1988))のアルゴリズムを使用し、PAM120ウェイトレジデューテーブル(weight residue table)、ギャップレングスペナルティー12、およびギャップペナルティー4を用いて決定される。

10

20

30

40

50

## 【0188】

本発明の方法はまた、20750のキメラタンパク質または融合タンパク質を使用し得る。本明細書中で使用される場合、20750の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非20750ポリペプチドに作動可能に連結された、20750ポリペプチドを含む。「20750ポリペプチド」は、20750分子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、一方、「非20750ポリペプチド」は、20750タンパク質に実質的に相同でないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド(例えば、20750タンパク質とは異なり、かつ同じ生物または異なる生物由来のタンパク質)をいう。20750融合タンパク質において、20750ポリペプチドは、20750タンパク質の全てまたは一部に対応し得る。好ましい実施形態において、20750融合タンパク質は、20750タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の好ましい実施形態において、20750融合タンパク質は、20750タンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結した」は、20750ポリペプチドおよび非20750ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されることを示すことが意図される。非20750ポリペプチドは、20750ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

## 【0189】

例えば、1つの実施形態において、融合タンパク質は、GST-20750融合タンパク質であり、ここで、20750配列は、GST配列のC末端に融合されている。このような融合タンパク質は、組換え20750の精製を容易にし得る。

## 【0190】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端において異種シグナル配列を含む20750タンパク質である。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)において、20750の発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用によって増大され得る。

## 【0191】

本発明の方法において使用される20750融合タンパク質は、薬学的組成物中に組み込まれ得、そして被験体にインピボで投与され得る。20750融合タンパク質は、20750基質のバイオアベイラビリティーに影響を与えるために使用され得る。20750融合タンパク質の使用は、例えば、以下によって引き起こされる障害の処置のために治療的

に有用であり得る：(i) 20750タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異；(ii) 20750遺伝子の誤調節；ならびに(iii) 20750タンパク質の異常な翻訳後修飾。

#### 【0192】

さらに、本発明の方法において使用される20750融合タンパク質は、被験体において抗20750抗体を産生するための免疫原として、20750リガンドを精製するために、そして20750と20750基質との相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて、使用され得る。

#### 【0193】

好ましくは、本発明の方法において使用される20750のキメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来技術に従って、例えば、連結のために平滑末端または付着末端を使用し、適切な末端を提供するための制限酵素消化を使用し、適切な場合粘着末端を平滑化し、所望でない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理を使用し、そして酵素的連結を使用することによって一緒にインフレームで連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成機を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、引き続いてアニーリングおよび再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成し得る2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを使用して実施され得る（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら、編、John Wiley & Sons : 1992を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をコードしている多くの発現ベクターが市販されている。20750をコードする核酸は、この融合部分が、20750タンパク質にインフレームで連結されるように、このような発現ベクター中にクローニングされ得る。

#### 【0194】

本発明はまた、20750アゴニスト（模倣物）または20750アンタゴニストのいずれかとして機能する、20750タンパク質の改変体の使用に関する。20750タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、20750タンパク質の別個の点変異または短縮）によって生成され得る。20750タンパク質のアゴニストは、20750タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じ生物学的活性またはそのサブセットを保持し得る。20750タンパク質のアンタゴニストは、例えば、20750タンパク質の20750媒介性の活性を競合的に調節することによって、20750タンパク質の天然に存在する形態の活性の1以上を阻害し得る。従って、特定の生物学的效果は、機能が限定された改変体を用いる処置によって誘発され得る。1つの実施形態において、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、20750タンパク質の天然に存在する形態を用いた処置と比較して、被験体における副作用がより小さい。

#### 【0195】

1つの実施形態において、20750アゴニスト（模倣物）または20750アンタゴニストのいずれかとして機能する20750タンパク質の改変体は、20750タンパク質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性について、20750タンパク質の変異体（例えば、短縮変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、同定され得る。1つの実施形態において、20750改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、そして多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。20750改変体の多様なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって生成され得、その結果、潜在的な20750配列の縮重セットは、個々のポリペプチドとしてか、あるいはその中に20750配列のセットを含むより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイについて）発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配

10

20

30

40

50

列から潜在的な 20750 改変体のライブラリーを生成するために、種々の方法が使用され得る。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化 DNA 合成機において実施され得、次いで、この合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、潜在的な 20750 配列の所望のセットをコードする全ての配列を 1 つの混合物中で提供することを可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakuraら、(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakuraら、(1984) *Science* 198: 1056; Ikeら、(1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477 を参照のこと）。

## 【0196】

10

さらに、20750 タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、20750 タンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のために、20750 フラグメントの多様な集団を生成するために使用され得る。1 つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、20750 コード配列の二本鎖 PCR フラグメントを、ニック形成が 1 分子当たりほぼ 1 回だけ生じるような条件下でヌクレアーゼで処理し、二本鎖 DNA を変性し、異なるニック形成産物由来のセンス / アンチセンス対を含み得る二本鎖 DNA を形成するために DNA を再生し、S1 ヌクレアーゼでの処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することによって、生成され得る。この方法によって、種々のサイズの 20750 タンパク質の N 末端フラグメント、C 末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする、発現ライブラリーが誘導され得る。

## 【0197】

20

点変異または短縮によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするためのいくつかの技術、および選択された特性を有する遺伝子産物についての cDNA ライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、20750 タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングのために適合可能である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高スループットの分析に使用されやすい、最も広く使用される技術は、代表的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングする工程、ベクターの得られたライブラリーで適切な細胞を形質転換する工程、および所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にするような条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現する工程を包含する。再帰的アンサンブル変異誘発 (recursive ensemble mutagenesis (REM))（これは、ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増強する新たな技術である）は、20750 改変体を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る（Arklin および Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811 - 7815; Delagrangeら、(1993) *Protein Eng.* 6 (3) : 327 - 331）。

30

## 【0198】

40

本発明の方法はさらに、抗 20750 抗体の使用を包含する。単離された 20750 タンパク質、またはそれらの一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を用いて、20750 に結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。全長の 20750 タンパク質が使用され得るか、あるいは 20750 の抗原性ペプチドフラグメントが免疫原として使用され得る。20750 の抗原性ペプチドは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 8 アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体が、20750 タンパク質と特異的な免疫複合体を形成するように、20750 のエピトープを含む。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも 10 アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも 15 アミノ酸残基、さらにより好ましくは、少なくとも 20 アミノ酸残基、そして最も好ましくは、少なくとも 30 アミノ酸残基を含む。

50

## 【0199】

抗原性ペプチドにより含まれる、好ましいエピトープは、タンパク質の表面に局在される 20750 の領域（例えば、親水性領域）、および高抗原性を有する領域である。

## 【0200】

20750 免疫原は、代表的に、適切な被験体（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物）を、免疫原を用いて免疫することにより抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された 20750 タンパク質または化学的に合成された 20750 ポリペプチドを含み得る。この調製物はさらに、アジュバント（例えば、フロイントアジュバントもしくは不完全フロイントアジュバント）、あるいは類似の免疫刺激剤を含み得る。免疫原性の 20750 の調製物を用いる適切な被験体の免疫は、ポリクローナル抗 20750 抗体の応答を誘導する。10

## 【0201】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原（例えば、20750）に、特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって生成され得る F(ab) フラグメントおよび F(ab')<sub>2</sub> フラグメントが挙げられる。本発明は、20750 分子に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、20750 の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の 1 つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的に、その抗体が免疫反応する、特定の 20750 タンパク質に対して単一結合親和性を示す。20

## 【0202】

ポリクローナル抗 20750 抗体は、20750 の免疫原を用いて適切な被験体を免疫することによって、上記のように調製され得る。免疫された被験体における、抗 20750 抗体の力価は、標準的な技術（例えば、免疫した 20750 を用いる、固相酵素免疫検出法（ELISA））によって、経時的にモニターされ得る。所望の場合、20750 に対する抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離され得、そしてさらに、周知の技術（例えば、IgG 画分を得るためにプロテイン A クロマトグラフィー）によって精製され得る。免疫後の適切なとき（例えば、抗 20750 抗体の力価が最も高いとき）に、抗体産生細胞は被験体から入手され得、そして標準的な技術（例えば、Kohler および Milstein (1975) Nature 256: 495-497）（Brown ら (1981) J. Immunol. 127: 539-46; Brown ら (1980) J. Biol. Chem. 255: 4980-83; Yeh ら (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2927-31; ならびに Yeh ら (1982) Int. J. Cancer 29: 269-75 もまた参考のこと）によってもともと記載されるハイブリドーマ技術、最近のヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor ら (1983) Immunol. Today 4: 72）、EBV-ハイブリドーマ技術（Cole ら (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）またはトリーマ技術）によってモノクローナル抗体を調製するために使用され得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成するための技術は周知である（一般的に、Kenneth, R. H.、Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lechner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54: 387-402; Gefter, M. L. ら (1977) Somatic Cell Genet. 3: 231-36 を参考のこと）。簡単に言えば、不死化した細胞株（代表的に黑色腫）は、上記のような 20750 免疫原で免疫した哺乳動物に由来するリンパ球（代表的に脾細胞）と融合され、そして得られたハイブリドーマ細胞の、細胞培養上清は、20750 に304050

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を同定するためにスクリーニングされる。

【0203】

リンパ球と不死化細胞株との融合のために使用される、任意の多くの周知のプロトコルが、抗20750モノクローナル抗体を生成する目的のために適用され得る（例えば、Galfre, G.ら（1977）Nature 266: 550-52; Gefterら（1977）前出；Lerner（1981）前出；およびKenneth（1980）前出を参照のこと）。さらに、当業者は、このような方法の多くのバリエーションもまた有用であることを理解する。代表的に、不死化細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）は、リンパ球と同一の哺乳動物由来である。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫したマウスに由来するリンパ球と、不死化マウス細胞株とを融合することによって作製され得る。好ましい不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン（「HAT培地」）を含む培養培地に感受性である、マウス骨髄腫細胞株である。任意の多くの骨髄腫細胞株（例えば、P3-NS1/1-Ag4-1骨髄腫細胞株、P3-x63-Ag8.653骨髄腫細胞株またはSp2/O-Ag14骨髄腫細胞株）が、標準的な技術に従う融合パートナーとして使用され得る。これらの骨髄腫細胞株は、ATCCから入手可能である。代表的に、HAT感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレンリコール（「PEG」）を用いてマウス脾細胞に融合される。次いで、融合によって得られたハイブリドーマ細胞は、HAT培地を用いて選択される（これは、融合していない骨髄腫細胞および非生産性融合骨髄腫細胞を殺傷する（融合していない脾細胞は形質転換されないので、数日後に死滅する））。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを用いて、20750に結合する抗体について、ハイブリドーマ培養物の上清をスクリーニングすることによって検出される。

【0204】

モノクローナル抗体スクリーニングハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗20750抗体は、20750を用いて、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定および単離され得、それによって、20750に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、the Pharnacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびthe Stratagene SurfZAP<sup>TM</sup> Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングにおける使用のために特に適切な方法および試薬の例は、以下において見出され得る：例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、PCT国際出願番号WO92/18619；Dowerら、PCT国際公開番号WO91/17271；Winterら、PCT国際公開WO92/20791；Marklandら、PCT国際公開番号WO92/15679；Breitlingら、PCT国際公開WO93/01288；McCaffertyら、PCT国際公開番号WO92/01047；Garrardら、PCT国際公開番号WO92/09690；LadnerらPCT国際公開番号WO90/02809；Fuchsら（1991）Bio/Technology 9:1369-1372；Hayら（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huseら（1989）Science 246:1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J 12:725-734；Hawkinsら（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896；Clacksonら（1991）Nature 352:624-628；Gramら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580；Garrardら（1991）Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboomら（1991）Nucleic Acid Res. 19:4133-4137；Barbasら（1991）50

) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 7978 - 7982 ; および McCaffertyら(1990) Nature 348 : 552 - 554。

### 【0205】

さらに、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る、組換え抗20750抗体（例えば、ヒトおよび非ヒトの両方の部分を含むキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体）は、本発明の方法の範囲内にある。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、以下に記載される方法を用いて、当該分野に公知の組換えDNA技術によって作製され得る：Robinsonら国際出願番号PCT/US86/02269；Akiraら、欧洲特許出願第184,187号；Taniuchi, M., 欧洲特許出願第171,496号；Morrisonら、欧洲特許出願第173,494号；Neubergerら、PCT国際公開番号WO86/01533；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧洲特許出願第125,023号；Betterら(1988) Science 240 : 1041 - 1043；Liuら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3439 - 3443；Liuら(1987) J. Immunol. 139 : 3521 - 3526；Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 214 - 218；Nishimuraら(1987) Can. Res. 47 : 999 - 1005；Woodら(1985) Nature 314 : 446 - 449；Shawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80 : 1553 - 1559；Morrison, S. L. (1985) Science 229 : 1202 - 1207；Oiら(1986) Biotechniques 4 : 214；Winter、米国特許第5,225,539号；Jonesら(1986) Nature 321 : 552 - 525；Verhoevenら(1988) Science 239 : 1534；およびBeidlerら(1988) J. Immunol. 141 : 4053 - 4060。  
10  
20  
20  
20

### 【0206】

抗20750抗体を用いて、（例えば、細胞溶解産物または細胞上清中の）20750タンパク質を検出して、20750タンパク質の発現の量およびパターンを評価し得る。抗20750抗体を診断的に用いて、臨床試験手順の一部として、組織中でのタンパク質レベルをモニタリングして、例えば、所定の処置レジメンの効力を決定し得る。検出は、この抗体を検出可能な物質へと結合させる（すなわち、物理的に連結させる）ことによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子族錯体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生体発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；そして適切な放射性物質の例としては、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>Sまたは<sup>3</sup>Hが挙げられる。  
30  
40

### 【0207】

(VII. 電子装置読み取り可能な媒体およびアレイ)

本発明の20750調節因子を含む電子装置読み取り可能な媒体もまた提供される。本明細書中で使用される場合、「電子装置読み取り可能な媒体」とは、電子装置によって読み取られ得そして直接アクセスされ得る、データまたは情報を、記憶、保持または含むための任意の適切な媒体をいう。このような媒体としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：磁気記憶媒体（例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記録媒体、および磁気テープ）；光学記憶媒体（例えば、コンパクトディスク）；電子記憶媒体（例えば、RAM、ROM、EPROM、EEPROMなど）；一般的ハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド（例えば、磁気／光学記憶媒体）。この媒体は、本  
50

発明のマークを記録されて適合または構成される。

【0208】

本明細書中で使用される場合、用語「電子装置」は、任意の適切な計算装置もしくは処理装置またはデータもしくは情報を記録するために構成もしくは適合された他のデバイスを包含するように意図される。本発明における使用に適切な電子装置の例としては、独立型計算装置；ネットワーク（ローカルエリアネットワーク（LAN）、ワイドエリアネットワーク（WAN）インターネット、イントラネット（Intranet）、およびエクストラネット（Extranet）を含む）；電子アプライアンス（例えば、パーソナルデジタルアシスタント（PDA）、携帯電話、ポケットベルなど）；ならびにローカル処理システムおよび分散処理システムが挙げられる。10

【0209】

本明細書中で使用される場合、「記録される」とは、電子装置読み取り可能媒体へと情報を記録またはコードするためのプロセスをいう。当業者は、公知の媒体に情報を記録して本発明の20750調節因子を含む製造品を作製するために現在公知の方法のいずれかを容易に採用し得る。

【0210】

種々のソフトウェアプログラムおよび形式を用いて、本発明のマーク情報を電子装置読み取り可能媒体に記録し得る。例えば、20750調節因子に対応する核酸配列は、ワード処理テキストファイルで表されてもよく、市販のソフトウェア（例えば、Word PerfectおよびMicrosoft Word）の形式にされてもよく、ASCIIファイル形式で表されてもよく、またはデータベースアプリケーション（例えば、DB2、Sybase、Oracleなど）ならびに他の形式で記録され得る。多数のデータ処理構造形式（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を用いて、本発明の20750調節因子が記録された媒体を入手または作製し得る。20

【0211】

本発明の20750調節因子を読み取り可能な形式で提供することによって、種々の目的でそのマーク配列情報に慣用的にアクセスし得る。例えば、当業者は、本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を、読み取り可能な形式で用いて、標的配列または標的構築モチーフと、データ記憶手段内に記録された配列情報とを比較し得る。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフと一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。30

【0212】

それゆえ、本発明は、被験体が細胞増殖障害を有するかまたは細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を実施するための指示書を保持するための媒体を提供し、ここで、この方法は、20750調節因子の存在または非存在を決定し、そしてこの20750調節因子の存在または非存在に基づいて、この被験体が、細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいは細胞増殖障害または細胞増殖障害前状態について特定の処置を推奨する工程を包含する。

【0213】

本発明はさらに、電子システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が、20750に関連する細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、ここで、この方法は、20750調節因子の存在または非存在を決定する工程、および20750調節因子の存在または非存在に基づいて、この被験体が、細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいは細胞増殖障害または細胞増殖障害前状態について特定の処置を推奨する工程を包含する。この方法はさらに、その被験体に関連した表現型情報を受け取る工程、および／またはネットワークから、その被験体に関連した表現型情報を獲得する工程を含み得る。

【0214】

本発明はまた、ネットワークにおいて、被験体が、20750調節因子に関連する細胞增4050

殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、この方法は、20750調節因子に関連する情報を受け取る工程、この被験体に関連した表現型情報を受け取る工程、このネットワークから、20750調節因子および／または細胞増殖障害に対応する情報を獲得する工程、ならびにこの表現型情報、20750調節因子、および獲得された情報のうちの1以上に基づいて、この被験体が、細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定する工程を包含する。この方法は、細胞増殖障害または細胞増殖障害前状態について特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

#### 【0215】

本発明はまた、被験体が、細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定するためのビジネス方法を提供し、この方法は、20750調節因子に関連する情報を受け取る工程、この被験体に関連した表現型情報を受け取る工程、このネットワークから、20750調節因子に対応する情報および／または細胞増殖障害に対応する情報を獲得する工程、ならびに、表現型情報、20750調節因子、および獲得した情報のうちの1以上に基づいて、この被験体が、細胞増殖障害または細胞増殖障害に対する素因を有するか否かを決定する工程を包含する。この方法は、細胞増殖障害または細胞増殖障害前状態について特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

#### 【0216】

本発明はまた、本発明の20750調節因子を含むアレイを包含する。このアレイを用いて、このアレイにおける1以上の遺伝子の発現をアッセイし得る。1つの実施形態では、このアレイを用いて、組織における遺伝子発現をアッセイして、このアレイにおける遺伝子の組織特異性を確認し得る。このようにして、約7600個までの遺伝子が、発現について同時にアッセイされ得る。これは、1以上の組織において特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロファイルが開発されることを可能にする。

#### 【0217】

このような定性的決定に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。従って、組織特異性だけでなく、組織中での一連の遺伝子の発現レベルも確認され得る。従って、遺伝子は、それらの組織発現自体およびその組織における発現レベルに基づいてグループ分けされ得る。これは、例えば、組織間での遺伝子発現の関連を確認する際に有用である。従って、1つの組織は、混乱され得、そして第2の組織における遺伝子発現に対する影響が決定され得る。これに関連して、生物学的刺激に応答した、1つの細胞型の別の細胞型への影響が決定され得る。このような決定は、遺伝子発現のレベルで、例えば、細胞-細胞相互作用の影響を知るために有用である。薬剤が1つの細胞型を処置するために治療的に投与されるが、別の細胞型に対して望ましくない影響を有する場合、本発明は、望ましくない影響の分子的基礎を決定するためのアッセイを提供し、従って、中和剤を同時投与するかさもなければ望ましくない影響を処置する機会を提供する。同様に、単一の細胞型内でさえ、望ましくない生物学的影响が、分子レベルで決定され得る。従って、標的遺伝子以外の発現に対する薬剤の影響が確認および中和され得る。

#### 【0218】

別の実施形態では、このアレイを用いて、このアレイ中の1以上の遺伝子の発現の時間経過をモニタリングし得る。これは、例えば、本明細書中に開示されるような、種々の生物学的状況（例えば、細胞増殖障害の発症、細胞増殖障害の進行、およびプロセス（例えば、細胞増殖障害に関連した細胞形質転換））において生じ得る。

#### 【0219】

このアレイはまた、同じ細胞または異なる細胞における他の遺伝子発現に対するその遺伝子発現の影響を確認するために有用である。これは、例えば、最終的または下流の標的が調節できない場合、治療介入のための代替の分子標的の選択を提供する。

#### 【0220】

このアレイはまた、正常細胞および異常細胞における1以上の遺伝子の示差的発現パターンを確認するために有用である。これは、診断または治療介入のための分子標的として役

10

20

30

40

50

立ち得る一連の遺伝子を提供する。

【0221】

本発明は、以下の実施例によってさらに例示される。以下の実施例は、限定すると解釈されるべきではない。本願を通して引用された全ての参考文献、特許および公開された特許出願ならびに配列表の内容は、本明細書中に参考として援用される。

【実施例】

【0222】

(実施例1：ヒト20750 cDNAの同定および特徴付け)

本実施例において、ヒト20750をコードする遺伝子の同定および特徴付けが記載される。

10

【0223】

(ヒト20750 cDNAの単離)

本発明は、本明細書中でヒト20750と称される新規ポリペプチドをコードするヒト遺伝子の発見に、少なくとも部分的に基づく。ヒトクローン55053の全配列が決定され、そしてヒト「20750」と称されるオープンリーディングフレームを含むことが見出された。ヒト20750遺伝子のヌクレオチド配列は、配列表に、配列番号1として記載される。ヒト20750発現産物のアミノ酸配列は、配列表に、配列番号2として記載される。20750ポリペプチドは、約439個のアミノ酸を含む。配列番号1のコード領域(オープンリーディングフレーム)は、配列番号3として記載される。

【0224】

(ヒト20750分子の分析)

配列番号2のポリペプチド配列を使用する検索を、PFAMにおいてHMMデータベースに対して実施し、配列番号2の残基約1～201において、ヒト20750のアミノ酸配列におけるプロテインキナーゼドメインを同定した(スコア=275.7)。

20

【0225】

配列番号2のポリペプチド配列を使用する検索をまた、Memsatデータベースに対して実施し、ヒト20750のアミノ酸配列(配列番号2)における潜在的な膜貫通ドメインを、残基約130～147で同定した(スコア=2.9)。

【0226】

ヒト20750のアミノ酸配列の検索を、Prositeデータベースに対してさらに実施した。これらの検索により、5つの潜在的なcAMP/cGMP依存性プロテインキナーゼリン酸化部位(Prosite登録番号PS00004)の、ヒト20750のアミノ酸配列を、配列番号2の残基約188～191、224～227、260～263、277～280、および394～397で同定した。グリコサミノグリカン結合部位(Prosite登録番号PS00002)もまた、残基約350～353で同定した。11個の潜在的なプロテインキナーゼCリン酸化部位(Prosite登録番号PS00005)を、配列番号2の残基約18～20、276～278、284～286、289～291、305～307、333～335、375～377、389～391、393～395、430～432、および435～437で同定した。2つの潜在的なN-ミリストイル化部位(Prosite登録番号PS00008)を、配列番号2の残基約237～242および349～354で同定した。2つのアミド化部位(Prosite登録番号PS00009)を、配列番号2の残基約119～122および222～225で同定した。3つの潜在的なカゼインキナーゼIIリン酸化部位(Prosite登録番号PS00006)を、配列番号2の残基約30～33、101～104、および172～175で同定した。セリン/スレオニンプロテインキナーゼ活性部位シグネチャー(Prosite登録番号PS00108)を、配列番号2の残基約68～80で同定した。

30

【0227】

ヒト20750のアミノ酸配列を、プログラムPSORTを用いて分析して、細胞内でのこのタンパク質の局在化を予測した。このプログラムは、問合せ配列における異なる標的化アミノ酸配列および局在化アミノ酸配列の存在を評価する。この分析の結果は、ヒト2

40

50

0750が、細胞質、核、またはペルオキシソームに局在し得ることを示す。

#### 【0228】

さらなる目的の相同性（可能なキナーゼ関連ドメインを含む）を、20750のアミノ酸配列（配列番号2）を使用して同定し、ProDomデータベース（ProDom（Protein Domain Database）ウェブサイトを介してオンラインで利用可能）を検索した。

（実施例2 TaqMan<sup>TM</sup>分析を用いた20750 mRNAの組織分布）

本実施例は、TaqMan<sup>TM</sup>手順を用いて決定されるような、種々の細胞および組織におけるヒト20750 mRNAの組織分布を記載する。Taqman<sup>TM</sup>手順は、mRNAを検出するための、定量的な逆転写PCRベースのアプローチである。RT-PCR反応は、PCRの間に、TaqMan<sup>TM</sup>プローブを切断するために、AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼの5'ヌクレオチド活性を活用する。簡単に言えば、cDNAを目的のサンプル（例えば、肺、卵巣、胸部、および結腸の腫瘍サンプルならびに正常サンプル）から生成し、そしてPCR增幅のための出発物質として使用した。5'遺伝子特異的プライマーおよび3'遺伝子特異的プライマーに加えて、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ（増幅されている領域に相補的である）を、この反応物（すなわち、Taqman<sup>TM</sup>プローブ）に含めた。Taqman<sup>TM</sup>プローブは、プローブの5'末端に共有結合した蛍光レポーター色素（例えば、FAM（6-カルボキシフルオレセイン）、TET（6-カルボキシ-4,7,2',7'-テトラクロロフルオレセイン）、JOE（6-カルボキシ-4,5-ジクロロ-2,7-ジメトキフルオレセイン）、もしくはVIC）、およびこのプローブの3'末端にクエンチャーカラー（TAMRA（6-カルボキシ-N,N,N',N'-テトラメチルローダミン）を有するオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0229】

PCR反応の間、プローブの切断は、レポーター色素およびクエンチャーカラーを分離し、結果としてレポーターの蛍光を増強する。PCR産物の蓄積を、レポーター色素の蛍光増強をモニタリングすることによって直接検出する。プローブがインタクトな場合、クエンチャーカラーに対してもレポーター色素の近位にレポーター蛍光の抑制が生じる。PCRの間、目的の標的が存在する場合、このプローブは順方向プライマー部位と逆方向プライマー部位との間の部位に特異的アニールする。AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼの5'-3'ヌクレオチド分解性（nucleolytic）活性は、プローブが標的にハイブリダイズする場合のみ、レポーターとクエンチャーカラーとの間でプローブを切断する。次いで、プローブフラグメントを、標的と置換し、そして鎖の重合を続ける。PCRの間、プローブの伸長を防ぐように、このプローブの3'末端をブロックする。このプロセスは全てのサイクルで生じ、そして産物の指數関数的な蓄積を妨げない。RNAを、トリゾール方法を使用して調製し、そして汚染したゲノムDNAを除去するためにDNaseで処理した。標準的な方法を使用してcDNAを合成した。逆転写酵素の非存在下において、コントロール遺伝子の検出可能なPCR増幅を有さないサンプルに生じるMock cDNA合成は、ゲノムDNA汚染の有効な除去を確認する。

#### 【0230】

正常組織および腫瘍形成組織を含むヒトパネルは、正常脳皮質組織および臍帯血管内非細胞（HUVVEC）における最も高い発現を伴って、ヒト20750発現の広い分布を示した（表1を参照のこと）。重要なことに、表1に示されるように、ヒト20750発現は、正常結腸組織サンプルおよび正常肺組織サンプルと比べて、結腸腫瘍サンプルおよび肺腫瘍サンプルにおいて3倍増加した。

#### 【0231】

乳癌細胞株、結腸癌細胞株、肺癌細胞株および卵巣癌細胞株ならびに293細胞株および293T細胞株を含む異種移植片もまた試験した。表2に示されるように、ヒト20750の発現を、全ての起源の細胞株（例えば、結腸癌細胞株、乳癌細胞株、および肺癌細胞株を含む）において検出した。

10

20

30

40

50

## 【0232】

正常サンプルおよび 固形腫瘍サンプルを含む 腫瘍性ヒトパネルは、 正常胸部サンプル、 正常肺サンプル、 および 正常結腸サンプルと比較して、 胸部腫瘍サンプル、 肺腫瘍サンプル、 および 結腸腫瘍サンプルにおいて、 ヒト20750の7倍～10倍の過剰発現を示した（表3を参照のこと）。

## 【0233】

正常結腸サンプル、 初期段階の腺癌サンプル、 結腸から肝臓への転移サンプル、 および 正常肝臓サンプルを含むパネルもまた試験した。 表4に示されるように、 ヒト20750は、 結腸から肝臓への転移サンプルの95%において過剰発現した。

## 【0234】

種々の段階の結腸癌（腺癌B段階サンプル、 腺癌C段階サンプル、 腺腫サンプル、 結腸から肝臓への転移サンプル、 腹腔結腸転移（abdominal colon metastasis）サンプル、 正常結腸サンプル、 および 正常肝臓サンプルを含む）に由来するサンプルを含む拡大された結腸パネルもまた、 試験した（表5を参照のこと）。 結果は、 結腸から肝臓への転移サンプルにおける過剰発現、 ならびに腺腫および原発性腫瘍A段階における有意な発現を示した。

## 【0235】

インビトロで合成された細胞周期パネルもまた試験した（表6を参照のこと）。 ヒト20750の発現を、 種々の時点で細胞周期を調節した癌細胞株のいくつかの細胞周期において試験した。 細胞周期調節の異常および細胞周期チェックポイントの異常は、 悪性細胞の発生を導く。 細胞増殖および細胞周期停止を調節するシグナルに応答する細胞の能力の喪失は、 癌を発症する共通の機構である。 細胞周期停止を引き起こす薬物で細胞株を同調することによって、 ある時点で、 細胞周期の種々の段階において調節された遺伝子を同定するためにプロファイルされ得る。 ヒト細胞の迅速な複製は、 約24時間（分裂に約30分かかり、 G1期に約9時間がかり、 S期に約10時間がかり、 G2期に約4.5時間がかかる）で全部の細胞周期を進行する。 ヒト20750の発現を、 細胞周期に入るよう同調し、 誘導したいくつかの癌細胞株において、 種々の時点で試験した。 結果は、 全ての時点で20750発現を示し、 そしてヒト腺癌DLD-1細胞において20750発現の増加を示した。

## 【0236】

インビトロ癌遺伝子細胞モデルに由来する細胞を含むパネルもまた、 試験した。 これらの癌遺伝子細胞モデルは、 癌の進行（例えば、 結腸癌の進行）に関与することが知られている腫瘍サプレッサーおよび癌遺伝子を一過性にトランスフェクトした細胞株およびそれらを安定にトランスフェクトした細胞株を含む。 表7および表8に示されるように、 ヒト20750は、 これらの多様な癌細胞モデルにおいて発現される。

## 【0237】

20750発現もまた、 Smad3<sup>-/-</sup>マウスモデルにおいて分析した。 Smad3<sup>-/-</sup>マウスは、 ヒト結腸直腸の発癌にとって有用であり、 かつ唯一のモデルである。 Smad3<sup>-/-</sup>マウスは、 ヒトの疾患に組織病理学的に似ている結腸癌腫を発症する。 疾患進行のいくつかの段階に由来するサンプル（正常上皮、 過形成上皮、 腺腫性ポリープ、 ならびに多様な程度の原発性癌腫およびリンパ節転移を含む）を単離し得る。 正常結腸サンプルおよび癌腫サンプルにおけるヒト20750の発現を、 12～14週および18～24週に調査した。 結果を表9に示す。 この結果は、 20750の発現が、 正常結腸組織と比べて、 初期段階腫瘍および後期段階腫瘍においてアップレギュレートされることを示す。

## 【0238】

ノコダゾール（Nonodazole）で処理した、 細胞周期を調節したHCT-116ヒト結腸癌腫細胞における20750発現の分析もまた、 調査した。 ノコダゾールは、 G2/M期において細胞周期を調節する。 結果は、 これらの細胞において、 ヒト20750発現が細胞周期のG2/M期の間にアップレギュレートされることを示し（表10を参照の

10

20

30

40

50

こと)、このことは、細胞増殖の間の 20750 発現を示す。

#### 【0239】

上記のデータは、癌腫(特に、結腸癌腫、肝臓への結腸転移、胸部癌腫、および肺癌腫)における 20750 mRNA の有意なアップレギュレートを示す。さらに、これらのデータは、細胞増殖を伴う 20750 の発現に関連する。20750 が多様な腫瘍において、正常サンプルと比較して腫瘍サンプルにおいて有意にアップレギュレートされて発現される場合、および 20750 が細胞増殖の間に発現される場合、20750 活性の阻害は、特に、結腸腫瘍、胸部腫瘍または肺腫瘍における腫瘍の形成または進行を阻害し得ると考えられる。

#### 【0240】

(実施例 3 : インサイチュ分析を用いた 20750 mRNA の組織分布) 10  
インサイチュ分析のために、種々の組織(例えば、正常な結腸、肝臓、胸部、および肺から得られた組織、ならびに結腸腫瘍、胸部腫瘍、および肺腫瘍、ならびに肝臓への結腸転移)を、最初にドライアイス上で凍結させた。これらの組織の 10 μm 厚さの切片を、DEPC 処理 1 × リン酸緩衝化生理食塩水中の 4 % ホルムアルデヒドで室温にて 10 分間後固定し、その後、DEPC 1 × リン酸緩衝化生理食塩水中で 2 回および 0.1 M トリエタノールアミン - HCl (pH 8.0) 中で 1 回リシスした。0.25 % 無水酢酸 - 0.1 M トリエタノールアミン - HCl 中で 10 分間インキュベートした後、切片を DEPC 2 × SSC (1 × SSC は、0.15 M NaCl + 0.015 M クエン酸ナトリウムである) 中でリシスした。次いで、組織を一連のエタノール洗浄液に通して脱水し、100 % クロロホルム中で 5 分間インキュベートし、次いで、100 % エタノール中で 1 分間および 95 % エタノール中で 1 分間リシスし、そして風乾させた。 20

#### 【0241】

ハイブリダイゼーションを、<sup>35</sup>S - 放射標識 ( $5 \times 10^7$  cpm/ml) cRNA プローブを用いて実施した。プローブを、600 mM NaCl、10 mM Tris (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.01 % 剪断サケ精子 DNA、0.01 % 酵母 tRNA、0.05 % 酵母総 RNA X1型、1 × デンハルト溶液、50 % ホルムアミド、10 % デキストラン硫酸、100 mM ジチオトレイトール、0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、および 0.1 % チオ硫酸ナトリウムを含む溶液の存在下で、55 にて 18 時間インキュベートした。 30

#### 【0242】

ハイブリダイゼーション後、スライドを、2 × SSC で洗浄した。次いで、切片を、37 にて、TNE (10 mM Tris - HCl (pH 7.6)、500 mM NaCl、および 1 mM EDTA を含む溶液) 中で 10 分間、1 mlあたり 10 μg の RNase A を含む TNE 中で 30 分間、そして最後に TNE 中で 10 分間、順次インキュベートした。次いで、スライドを、室温にて 2 × SSC でリシスし、50 にて 1 時間、2 × SSC で洗浄し、55 にて 1 時間、0.2 × SSC で洗浄し、そして 60 にて 1 時間、0.2 × SSC で洗浄した。次いで、切片を、連続エタノール - 0.3 M 酢酸ナトリウム濃縮物を通して迅速に脱水し、その後、風乾し、そして Kodak Biomax MR 科学的画像化フィルムに 24 時間にわたって曝露し、続いて NB - 2 写真乳剤 (phot oemulsion) に浸し、そして 4 にて 7 日間曝露し、その後現像し、そして対比染色した。 40

#### 【0243】

インサイチュハイブリダイゼーションの結果は、試験した 4 つの正常結腸組織サンプルのうちの 1 つ、試験した 6 つの結腸腫瘍サンプルのうちの 6 つ、試験した 5 つの肝臓への肝臓転移サンプルのうちの 5 つ、そして試験した 2 つの正常肝臓サンプルのうちの 2 つにおいて、20750 の発現を示した。原発性結腸腫瘍サンプルおよび転移性癌腫サンプルにおいてもまた、中程度 ~ 強い発現が観察された。正常肝臓サンプルおよび正常結腸サンプルは、結腸腫瘍サンプルと比較して、20750 の過度の発現が示される。結果はさらに、試験した 2 つの正常胸部組織サンプルのうちの 2 つ、および試験した 4 つの胸部腫瘍組 50

織サンプルのうちの4つにおいて、胸部腫瘍組織と比較して正常導管上皮における適度な発現を伴って20750の発現を示す。結果はまた、試験した4つの肺腫瘍組織のうち4つ、および2つの正常肺組織のうち2つにおいて、中程度～強い発現を示す。

#### 【0244】

上記のTaqman分析によって示される発現パターンを確認するこれらの結果は、ほとんどの腫瘍型において20750の広範な発現を示す。20750は、正常結腸組織および正常肝臓組織と比べて、結腸腫瘍および肝臓転移において；正常胸部組織と比べて胸部腫瘍において；そして正常肺組織と比べて肺腫瘍において差示的に発現される。従って、20750の阻害は、特に結腸腫瘍における腫瘍の進行または形成を阻害し得る。

#### 【0245】

(実施例4：細菌細胞における組換え20750タンパク質の発現)

本実施例において、ヒト20750を、組換えグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)融合ポリペプチドとして、E.coli中に発現させ、そしてこの融合ポリペプチドを、単離および特徴付けする。特に、20750をGSTに融合させ、そしてこの融合ポリペプチドを、E.coli(例えば、PEB199株)に発現させる。PEB199でのGST-20750融合タンパク質の発現を、IPTGで誘導する。この組換え融合ポリペプチドを、グルタチオンビーズでのアフィニティクロマトグラフィーによって、誘導したPEB199株の粗細菌溶解物から精製する。細菌溶解物から精製したポリペプチドのポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を使用して、生じた融合ポリペプチドの分子量を決定する。

#### 【0246】

(実施例5：COS細胞における組換え20750タンパク質の発現)

COS細胞においてヒト20750遺伝子を発現させるために、Invitrogen Corporation(San Diego, CA)製のpcDNA/Ampベクターを使用する。このベクターは、SV40複製起点、アンピシリン耐性遺伝子、E.coli複製起点、ポリリンカー領域が続くCMVプロモーター、ならびにSV40イントロンおよびポリアデニル化部位を含む。20750タンパク質全体をコードするDNAフラグメント、ならびにこのフラグメントの3'末端にインフレームで融合されたHAタグ(Wilsonら(1984)Cell 37:767)またはFLAGタグを、このベクターのポリリンカー領域にクローニングし、これにより、CMVプロモーターの制御下で組換えタンパク質の発現を配置する。

#### 【0247】

このプラスミドを構築するために、20750DNA配列を、2つのプライマーを使用するPCRによって増幅する。5'プライマーは、目的の制限部位、次いで、開始コドンから始まる20750コード配列の約20ヌクレオチドを含む；3'末端配列は、目的の他の制限部位に対する相補配列、翻訳終止コドン、HAタグまたはFLAGタグ、および20750コード配列の最後の20ヌクレオチドを含む。PCR増幅したフラグメントおよびpcDNA/Ampベクターを、適切な制限酵素で消化し、このベクターを、CIAP酵素(New England Biolabs, Beverly, MA)を使用して脱リン酸化する。好ましくは、この選択された2つの制限部位は異なり、その結果、20750遺伝子は、正確な方向で挿入される。連結混合物を、E.coli細胞(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CAより入手可能なHB101株、DH5<sup>+</sup>株、SURE株を使用し得る)に形質導入し、この形質導入した培養物を、アンピシリン培地プレートにプレーティングし、耐性コロニーを選択する。プラスミドDNAを、形質転換体から単離し、そして正確なフラグメントの存在について制限分析により試験する。

#### 【0248】

引き続きCOS細胞を、リン酸カルシウム法または塩化カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクションあるいはエレクトロポレーションを使用して、20750-pcDNA/AmpプラスミドDNAでトランスフェクトす

10

20

30

40

50

る。宿主細胞をトランスフェクトするための他の適切な方法を、Sambrook, J., Fritsch, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に見出し得る。20750ポリペプチドの発現を、放射標識(NEN, Boston, MAより入手可能な<sup>35</sup>S-メチオニンまたは<sup>35</sup>S-システインを使用し得る)およびHA特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降(Harlow, E. およびLane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988)によって検出する。<sup>10</sup>簡単には、細胞を、<sup>35</sup>S-メチオニン(または<sup>35</sup>S-システイン)で8時間標識する。次いで、この培養培地を収集し、そして界面活性剤(RIPA緩衝液(150 mM NaCl、1% NP-40、0.1% SDS、0.5% DOC、50 mM Tris(pH 7.5))を使用して細胞を溶解する。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体で沈降させる。次いで、沈降したポリペプチドを、SDS-PAGEによって分析する。

#### 【0249】

あるいは、20750コード配列を含むDNAを、適切な制限部位を使用してpCDNA/Ampベクターのポリリンカーに直接クローニングする。生じたプラスミドを、上記の様式にてCOS細胞にトランスフェクトし、そして20750ポリペプチドの発現を、放射標識および20750特異的モノクローナル抗体を使用する免疫沈降によって検出する。<sup>20</sup>。

#### (等価物)

当業者は、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認識するか、または慣用的にすぎない実験法を使用してこれらの等価物を確認し得る。このような等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが意図される。

## 【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  
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/037257 A2(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: A61K

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KU, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US02/34574

(22) International Filing Date: 29 October 2002 (29.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/335,006 31 October 2001 (31.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(84) Designated States (regional): AR IPO patent (GI, GM,

KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW);

Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TU, TM);

European patent (AL, BI, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

ES, IT, FR, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAIP patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG);

(72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): WILLIAMSON, Mark [US/US]; 15 Stonecrest Drive, Sanger, MA 01906 (US).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.

(74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).



A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS USING 20750

(55) Abstract: The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, e.g., cancer, including, but not limited to colon, breast, and lung cancer. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a cellular proliferation disorder. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a cellular proliferation disorder. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 20750 polypeptide activity or aberrant 20750 nucleic acid expression.

WO 03/037257 A2

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT  
OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS USING 20750**

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/335,006, 5 filed October 31, 2001, the entire contents of which are herein incorporated by reference.

Cancer is the second leading cause of death in the United States, after heart disease (Boring, *et al.*, (1993) *CA Cancer J. Clin.* 43:7). Cancer is characterized primarily by an increase in the number of abnormal, or neoplastic, cells derived from a normal tissue which proliferate to form a tumor mass, the invasion of adjacent tissues by these neoplastic tumor 10 cells, and the generation of malignant cells which spread via the blood or lymphatic system to regional lymph nodes and to distant sites. The latter progression to malignancy is referred to as metastasis.

Colorectal cancer is among the most common cancers affecting the western world. An estimated 129,400 new cases of colorectal cancer occurred in the United States in 1999 15 (Rudy, *et al.* (2000) *Am Fam Physician* 61(6):1759-70, 1773-4). By the age of 70 years, at least 50% of the Western population will develop some form of colorectal tumor, including early benign polyps and invasive adenocarcinomas. It is estimated that approximately 10% of the benign polypoid lesions will progress to invasive carcinoma (Fahy *et al.* (1998) *Surg Oncol* 7(3-4):115-23). Colorectal cancer arises from a precursor 20 lesion, the adenomatous polyp, which forms in a field of epithelial cell hyperproliferation and crypt dysplasia. Progression from this precursor lesion to colorectal cancer is a multistep process (Winawer (1999) *Am J Med* 106(1A):3S-6S).

Lung cancer is the most common form of cancer in the world. Estimates for the year 1985 indicate that there were about 900,000 cases of lung cancer worldwide. (Parkin 25 *et al.*, (1993) *Int J Cancer*; 54:594-606). For the United States alone, 1993 projections placed the number of new lung cancer cases at 170,000, with a mortality of about 88%. (Boring *et al.*, *supra*). Although the occurrence of breast cancer is slightly more common in the United States, lung cancer is second behind prostate cancer for males and third behind breast and colorectal cancers for women. Yet, lung cancer is the most common 30 cause of cancer deaths.

The World Health Organization classifies lung cancer into four major histological types: (1) squamous cell carcinoma (SCC), (2) adenocarcinoma, (3) large cell carcinoma, and (4) small cell lung carcinoma (SCLC). (The World Health Organization, *Am J Clin*

WO 03/037257

PCT/US02/34574

*Pathol* (1982) 77:123-136). However, there is a great deal of tumor heterogeneity even within the various subtypes, and it is not uncommon for lung cancer to have features of more than one morphologic subtype. The term non-small cell lung carcinoma (NSCLC) includes squamous, adenocarcinoma and large cell carcinomas.

- 5 Early detection is difficult since clinical symptoms are often not seen until the disease has reached an advanced stage. Currently, diagnosis is aided by the use of chest x-rays, analysis of the type of cells contained in sputum and fiberoptic examination of the bronchial passages. Treatment regimens are determined by the type and stage of the cancer, and include surgery, radiation therapy and/or chemotherapy. In spite of
- 10 considerable research into therapies for the disease, lung cancer remains difficult to treat.

Breast carcinoma or cancer is a major medical problem for women beginning in the third decade of life and continuing throughout senescence. It is currently estimated that in the United States women have a one in eight chance of developing the disease in their lifetime (by the age of eighty), whereas one in twenty-eight women have a lifetime risk of 15 dying from breast cancer (Harris *et al.*, Ed. *Diseases of the Breast*, 1996: pp. 159-168). Carcinoma of the breast is the third most common cancer, and the most common cancer in women. It is a major cause of mortality in women, as well as a cause of disability, psychological trauma, and economic loss. Breast carcinoma is the second most common cause of cancer death in women in the United States, and for women between the ages of 20 15 and 54, the leading cause of cancer-related death (Forbes, *Seminars in Oncology*, vol. 24(1), Suppl 1, 1997: pp.S1-20-S1-35). Indirect effects of the disease also contribute to the mortality from breast cancer including consequences of advanced disease, such as metastases to the bone or brain. Complications arising from bone marrow suppression, radiation fibrosis and neutropenic sepsis, collateral effects from therapeutic interventions, 25 such as surgery, radiation, chemotherapy, or bone marrow transplantation-also contribute to the morbidity and mortality from this disease.

Based on the prevalence of these disorders and the lack of effective cures and early diagnostics, there currently exists a great need for methods and compositions which can serve as markers before the onset of symptoms and which can serve as a means for 30 identifying therapeutics to treat and/or cure these disorders.

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, *e.g.*, cancer, including, but not limited to colon cancer, breast cancer, and lung cancer. The present invention is based, at least in part, on

WO 03/037257

PCT/US02/34574

the discovery that the 20750 molecule, a novel member of the protein kinase family, is differentially expressed in tumor cells, *e.g.*, colon, lung, and breast tumor cells, as compared to normal cells, *e.g.*, normal colon, lung, and breast cells, and is highly elevated in tissues derived from colon metastases to the liver as compared to normal liver tissue,

5 and thus is useful in the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, *e.g.*, cancer, including, but not limited to, colon, lung, and breast cancer. Without intending to be limited by mechanism, it is believed that the 20750 molecules, by influencing the stability of  $\beta$ -catenin, modulate carcinogenesis through the Wnt-signaling pathway and are, therefore, useful as targets and therapeutic agents for the treatment, prognosis, or

10 diagnosis, of cellular proliferation disorders, such as cancer.

Accordingly, the present invention provides methods for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, *e.g.*, cancer, including, but not limited to, colon, breast, and lung cancer.

In one aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable

15 of treating a cellular proliferation disorder, *e.g.*, cancer, including, but not limited to colon, breast, and lung cancer. The method includes assaying the ability of the compound to modulate 20750 nucleic acid expression or 20750 polypeptide activity. In one embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 20750 polypeptide activity is determined by detecting modulation of cellular proliferation, *e.g.*,

20 proliferation of a tumor cell. In another embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 20750 polypeptide activity is determined by detecting modulation of the concentration of  $\beta$ -catenin in a cell.

In another aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of modulating a 20750 activity, *e.g.*, intracellular  $\beta$ -catenin concentration, cellular

25 proliferation, cellular growth, cellular migration or the Wnt-signaling pathway. The method includes contacting a cell expressing a 20750 nucleic acid or polypeptide molecule (*e.g.*, a colon tumor cell, a lung tumor cell, or a breast tumor cell) with a test compound and assaying the ability of the test compound to modulate 20750 nucleic acid expression or 20750 polypeptide activity.

30 Another aspect of the invention provides a method for modulating a cellular growth, migration differentiation, or proliferation process. The method includes contacting a cell with a 20750 modulator, for example, an anti-20750 antibody, a 20750 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof, a 20750

WO 03/037257

PCT/US02/34574

polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a small molecule, an antisense 20750 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1 or a

5 fragment thereof, or a ribozyme.

In yet another aspect, the invention features a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder, e.g., a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 20750 polypeptide activity or aberrant 20750 nucleic acid expression, such as cancer. In a preferred embodiment, the cellular proliferation disorder is colon cancer, lung

10 cancer, or breast cancer. The method includes administering to the subject a therapeutically effective amount of a 20750 modulator, e.g., in a pharmaceutically acceptable formulation or by using a gene therapy vector. Embodiments of this aspect of the invention include the 20750 modulator being a small molecule, an anti-20750 antibody, a 20750 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a fragment

15 thereof, a 20750 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an antisense 20750 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof, or a ribozyme.

20 In another aspect, the invention provides a method for modulating, e.g., increasing or decreasing, cellular proliferation in a subject by administering to the subject a 20750 modulator.

Also featured are methods of regulating metastasis in a subject or inhibiting tumor progression in a subject which include administering to the subject an effective amount of 25 an 20750 modulator (e.g., an 20750 inhibitor).

The present invention is based also in part, on the discovery of novel members of the family of protein kinases, referred to herein as "20750" nucleic acid and protein molecules. The 20750 nucleic acid and protein molecules of the present invention are useful as modulating agents in regulating a variety of cellular processes, e.g.,  $\beta$ -catenin 30 stability, cellular proliferation, cellular growth, cellular migration, or the Wnt-signaling pathway.

In one embodiment, the invention features an isolated nucleic acid molecule that includes the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In another

WO 03/037257

PCT/US02/34574

embodiment, the invention features an isolated nucleic acid molecule that encodes a polypeptide including the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2.

In still other embodiments, the invention features isolated nucleic acid molecules including nucleotide sequences that are substantially identical (*e.g.*, 60% identical) to the 5 nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. The invention further features isolated nucleic acid molecules including at least 68 contiguous nucleotides of the nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In another embodiment, the invention features isolated nucleic acid molecules which encode a polypeptide including an amino acid sequence that is substantially identical (*e.g.*, 60% identical) to the 10 amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:2. The present invention also features nucleic acid molecules which encode allelic variants of the polypeptide having the amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:2. In addition to isolated nucleic acid molecules encoding full-length polypeptides, the present invention also features nucleic acid molecules which encode fragments, for example, biologically active or antigenic 15 fragments, of the full-length polypeptides of the present invention (*e.g.*, fragments including at least 215 contiguous amino acid residues of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2). In still other embodiments, the invention features nucleic acid molecules that are complementary to, antisense to, or hybridize under stringent conditions to the isolated nucleic acid molecules described herein.

20 In another aspect, the invention provides vectors including the isolated nucleic acid molecules described herein (*e.g.*, 20750-encoding nucleic acid molecules). Such vectors can optionally include nucleotide sequences encoding heterologous polypeptides. Also featured are host cells including such vectors (*e.g.*, host cells including vectors suitable for producing 20750 nucleic acid molecules and polypeptides).

25 In another aspect, the invention features isolated 20750 polypeptides and/or biologically active or antigenic fragments thereof. Exemplary embodiments feature a polypeptide including the amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:2, a polypeptide including an amino acid sequence at least 60% identical to the amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:2, a polypeptide encoded by a nucleic acid molecule including a 30 nucleotide sequence at least 60% identical to the nucleotide sequence set forth as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. Also featured are fragments of the full-length polypeptides described herein (*e.g.*, fragments including at least 215 contiguous amino acid residues of

WO 03/037257

PCT/US02/34574

the sequence set forth as SEQ ID NO:2) as well as allelic variants of the polypeptide having the amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:2.

- The 20750 polypeptides and/or biologically active or antigenic fragments thereof, are useful, for example, as reagents or targets in assays applicable to treatment and/or diagnosis of 20750 mediated or related disorders. In one embodiment, a 20750 polypeptide or fragment thereof, has a 20750 activity. In another embodiment, a 20750 polypeptide or fragment thereof, includes at least one of the following domains: a transmembrane domain, a protein kinase domain, and optionally, has a 20750 activity. In a related aspect, the invention features antibodies (e.g., antibodies which specifically bind to any one of the polypeptides described herein) as well as fusion polypeptides including all or a fragment of a polypeptide described herein.

- The present invention further features methods for detecting 20750 polypeptides and/or 20750 nucleic acid molecules, such methods featuring, for example, a probe, primer or antibody described herein. Also featured are kits e.g., kits for the detection of 20750 polypeptides and/or 20750 nucleic acid molecules. In a related aspect, the invention features methods for identifying compounds which bind to and/or modulate the activity of a 20750 polypeptide or 20750 nucleic acid molecule described herein. Further featured are methods for modulating a 20750 activity.

- Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

Table 1 is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in a human normal and tumor tissue panel (1=normal artery, 2=diseased artery, 3=normal vein, 4=coronary smooth muscle cells, 5=HUEC, 6=hemangioma, 7=normal heart tissue, 8=congestive heart failure (CHF) heart tissue, 9=kidney tissue, 10=skeletal muscle, 11=normal adipose, 12=pancreas tissue, 13=primary osteoblasts, 14=differentiated osteoclasts, 15=normal skin tissue, 16=normal spinal cord, 17=normal brain cortex, 18=brain hypothalamus, 19=nerve tissue, 20=dorsal root ganglia (DRG), 21=normal breast tissue, 22=normal ovary tissue, 23=ovary tumor tissue, 24=normal prostate tissue, 25=prostate tumor tissue, 26=salivary glands, 27=normal colon tissue, 28=colon tumor tissue, 29=lung normal tissue, 30=lung tumor tissue, 31=chronic obstructive pulmonary disease (COPD) lung tissue, 32=inflammatory bowel disease (IBD) colon tissue, 33=normal liver tissue, 34=liver fibrosis tissue, 34=normal spleen tissue, 36=normal tonsil tissue, 37=lymph node tissue, 38=small intestine tissue,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

39=macrophages, 40=synovium, 41=bone marrow, 42=activated PBMC, 43=neutrophils, 44=megakaryocytes, 45=erythroid tissue, 46=positive control).

*Table 2* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in a xenograft panel comprising breast, colon, lung and breast cancer cell lines as well as 293 and 293T cell lines(1=MCF-7 breast tumor, 2=ZR75 breast tumor, 3=T47D breast tumor, 4=MDA 231 breast tumor, 5=MDA 435 breast tumor, 6=SkBr3 breast tumor, 7=DLD-1 colon tumor (stage C), 8=SW480 colon tumor (stage B), 9=SW620 colon tumor (stage C), 10=HCT-116 colon tumor, 11=HT-29 colon tumor, 12=Colo-205 colon tumor, 13=NCI-H125 lung tumor, 14=NCI-H69 lung tumor, 15=NCI-H322 primary bronchioloalveolar carcinoma, 16=NCI-H460 lung tumor, 17=A549 lung tumor, 18=normal human bronchial epithelium (NHBE), 19=SKOV-3 ovary tumor, 20=OVCAR-3 ovary tumor, 21=293 baby kidney, 22=293T baby kidney).

*Table 3* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in an oncology human panel comprising normal and solid tumor samples (1-3=normal breast, 4-8=breast tumor, 9=lymph, 10=lung (breast), 11-12=normal ovary, 13-17=ovary tumor, 18-20=normal lung, 21-26=lung tumor, 27-29=normal colon, 30-33=colon tumor, 34-35=colon tumor - liver metastasis, 36=normal liver (female), 37=cervix, 38=cervix - squamous, 39=human microvascular endothelial cells (HMVECs), arrested, 40=human microvascular endothelial cells (HMVECs), proliferating, 41=hemangioma, 42=HCT-116 normoxic, 43=HCT-116 hypoxic, 44-45=prostate, 46=normal prostate tumor, 47=prostate tumor).

*Table 4* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in an panel comprising normal colon samples, early stage adenocarcinomas, colon to liver metastases, and normal liver samples (1-3=normal colon, 4-5= colonic ACA-C, 6=colonic ACA-B, 7= adenocarcinoma, 8-24=colon to liver metastases, 25-27=normal liver).

*Table 5* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in a colonic ACA panel (1-5=normal colon samples, 6-7=adenomas, 8-11=stage B adenocarcinoma samples, 12-17=stage C adenocarcinoma samples, 18-22=normal liver samples, 23-27=colon to liver metastasis samples, 28=abdominal colon metastasis).

*Table 6* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA expression in an *in vitro* synchronized cell cycle panel (1=HCT-116 aphidicolin t=0, 2=

WO 03/037257

PCT/US02/34574

HCT-116 aphidicolin t=3, 3=HCT-116 aphidicolin t=6, 4=HCT-116 aphidicolin t=9,  
 5=HCT-116 aphidicolin t=12, 6=HCT-116 aphidicolin t=15, 7=HCT-116 aphidicolin t=18,  
 8=HCT-116 aphidicolin t=21, 9=HCT-116 aphidicolin t=24, 10=HCT-116 nocodazole  
 t=0, 11=HCT-116 nocodazole t=3, 12=HCT-116 nocodazole t=6, 13=HCT-116  
 5 nocodazole t=9, 14=HCT-116 nocodazole t=15, 15=HCT-116 nocodazole t=18, 16=HCT-  
 116 nocodazole t=21, 17=HCT-116 nocodazole t=24, 18=DLD-1 nocodazole t=3,  
 19=DLD-1 nocodazole t=6, 20=DLD-1 nocodazole t=9, 21=DLD-1 nocodazole t=12,  
 22=DLD-1 nocodazole t=15, 23=DLD-1 nocodazole t=18, 24=DLD-1 nocodazole t=21,  
 25=A549 mimosine t=0, 26=A549 mimosine t=3, 27=A549 mimosine t=6, 28=A549  
 10 mimosine t=9, 29=A549 mimosine t=15, 30=A549 mimosine t=18, 31=A549 mimosine  
 t=21, 32=A549 mimosine t=24, 33=MCF10A mimosine t=0, 34=MCF10A mimosine t=3,  
 35=MCF10A mimosine t=6, 36=MCF10A mimosine t=9, 37=MCF10A mimosine t=12,  
 38=MCF10A mimosine t=18, 39=MCF10A mimosine t=21, 40=MCF10A mimosine  
 t=24).

15 *Table 7* is a graph depicting the results of a TaqMan™ analysis of 20750 cDNA  
 expression in an *in vitro* oncogene cell model panel comprising various cell lines  
 transfected with k-ras (1= Smad4-Sw480 control, 2=Smad4-Sw480 (24 hours), 3= Smad4-  
 Sw480 (48 hours), 4= Smad4-Sw480 (72 hours), 5=L51747-mucinous, 6=HT29 non-  
 mucinous, 7=SW620 non-mucinous, 8=CSC-1 normal, 9=NCM-460 normal, 10=HCT-116  
 20 rer+, 11=SW480 RER+, 12=SW480 rer -, 13=CACO rer -, 14=JDLD-1, 15=JHCT-116,  
 16=DKO1, 17=DKO4, 18=DKS-8, 19=Hke3, 20=HKh2, 21=HK2-6, 22=e3Ham#9,  
 23=APC5 -, 24=AP6 -, 25=APC1 +/+, 26=APC13 +/+).

25 *Table 8* is a graph depicting a larger view various samples from the TaqMan™  
 analysis of 20750 cDNA expression in an *in vitro* oncogene cell model panel shown in  
*Table 7* (1=JDLD-1, 2=DKO1, 3=DKO4, 4=DKS-8, 5=JHCT-116, 6=HK2-6, 7=Hke3,  
 8=HKh2, 9=eHam#9).

30 *Table 9* is a graph depicting 20750 expression in a *Smad3*<sup>-/-</sup> mouse model.  
 Expression in normal colon samples at (1)12-14 weeks and (2)18-24 weeks and adenoma  
 samples at (3)12-14 weeks and (4)18-24 weeks was investigated.

*Table 10* is a graph depicting 20750 expression in cell cycle regulated HCT-116  
 human colon carcinoma cells treated with nocodazole at various time points (1=t=0h, 2=  
 t=3h, 3=t=6h, 4=t=9h, 5=t=15h, 6=t=18h, 7=t=21h, 8=t=24h).

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**Table 1:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	Artery normal	20.0535
2	Aorta diseased	7.239
3	Vein normal	9.8204
4	Coronary SMC	62.5
5	HUVEC	231.647
6	Hemangioma	20.4749
7	Heart normal	39.83
8	Heart CHF	23.8478
9	Kidney	19.1038
10	Skeletal Muscle	42.9857
11	Adipose normal	10.9343
12	Pancreas	27.6802
13	primary osteoblasts	25.9162
14	Osteoclasts (diff)	3.9471
15	Skin normal	32.2401
16	Spinal cord normal	14.5786
17	Brain Cortex normal	177.3904
18	Brain Hypothalamus normal	70.0729
19	Nerve	15.4834
20	DRG (Dorsal Root Ganglion)	33.4929
21	Breast normal	19.6408
22	Ovary normal	14.6293
23	Ovary Tumor	11.3592
24	Prostate Normal	16.8046
25	Prostate Tumor	29.1573
26	Salivary glands	9.3553
27	Colon normal	6.6382
28	Colon Tumor	16.8629
29	Lung normal	8.7591
30	Lung tumor	29.7699
31	Lung COPD	6.1084
32	Colon IBD	1.4347
33	Liver normal	4.996
34	Liver fibrosis	19.1701
35	Spleen normal	6.1722

WO 03/037257

PCT/US02/34574

36	Tonsil normal	8.9742
37	Lymph node normal	12.0904
38	Small intestine normal	4.0022
39	Macrophages	2.5329
40	Synovium	1.835
41	BM-MNC	5.4294
42	Activated PBMC	2.6586
43	Neutrophils	3.4962
44	Megakaryocytes	20.0535
45	Erythroid	25.3829
46	positive control	108.8188

**Table 2:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	MCF-7 Breast T	61.0
2	ZR75 Breast T	290.2
3	T47D Breast T	55.0
4	MDA 231 Breast T	45.6
5	MDA 435 Breast T	20.2
6	SKBr3 Breast	67.7
7	DLD 1 ColonT (stageC)	258.8
8	SW430 Colon T (stage B)	44.2
9	SW620 ColonT (stageC)	45.3
10	HCT116	119.1
11	HT29	21.3
12	Colo 205	7.8
13	NCI-H125	244.9
14	NCI-H67	143.6
15	NCI-H322	119.9
16	NCI-H460	116.2
17	A549	113.4
18	NHBE	288.2
19	SKOV-3 ovary	58.1
20	OVCAR-3 ovary	75.9
21	293 Baby Kidney	390.9
22	293T Baby Kidney	277.4

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**Table 3:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	PIT 400 Breast N	1.95
2	PIT 372 Breast N	3.33
3	CHT 1228 Breast N	19.92
4	MDA 304 Breast T: MD-IDC	9.49
5	CHT 2002 Breast T: IDC	20.69
6	MDA 236-Breast T:PD-IDC(ILC?)	5.45
7	CHT 562 Breast T: IDC	10.27
8	NDR 138 Breast T ILC (LG)	31.91
9	CHT 1841 Lymph node (Breast met)	25.38
10	PIT 58 Lung (Breast met)	11.28
11	CHT 620 Ovary N	27.39
12	CHT 619 Ovary N	61.21
13	CLN 012 Ovary T	22.17
14	CLN 07 Ovary T	4.76
15	CLN 17 Ovary T	14.48
16	MDA 25 Ovary T	12.96
17	CLN 08 Ovary T	5.10
18	PIT 298 Lung N	7.95
19	MDA 185 Lung N	1.65
20	CLN 930 Lung N	4.06
21	MPI 215 Lung T-SmC	37.68
22	MDA 259 Lung T-PDNSCCL	43.59
23	CHT 832 Lung T-PDNSCCL	14.99
24	MDA 262 Lung T-SCC	37.16
25	CHT 793 Lung T-ACA	25.65
26	CHT 331 Lung T-ACA	33.49
27	CHT 405 Colon N	1.63
28	CHT 1685 Colon N	13.65
29	CHT 371 Colon N	2.14
30	CHT 382 Colon T: MD	2.70
31	CHT 528 Colon T: MD	6.90
32	CLN 609 Colon T	13.37
33	NDR 210 Colon T: MD-PD	8.58
34	CHT 340 Colon-Liver Met	20.98
35	CHT 1637Colon-Liver Met	14.58

WO 03/037257

PCT/US02/34574

36	PIT 260 Liver N (female)	2.66
37	CHT 1653 Cervix Squamous CC	43.28
38	CHT 569 Cervix Squamous CC	7.63
39	A24 HMVEC-Arr	83.33
40	C48 HMVEC-Prol	60.58
41	Pooled Hemangiomas	5.60
42	HCT116N22 Normoxic	241.48
43	HCT116H22 Hypoxic	190.78
44	CHT 31 Prostate N	27.11
45	CHT 33 Prostate N	15.46
46	CHT 1269 Prostate T: St 5	37.42
47	PIT 120 Prostate T: St 7	43.28

**Table 4:**

Tissue Type	Relative Expression
CHT 371 Colon N	1.04
CHT 523 Colon N	9.62
NDR 104 Colon N	11.72
CHT 520 Colonic ACA-C	7.21
CHT 1365 Colonic ACA-C	11.01
CHT 382 Colonic ACA-B	8.70
CHT 122 Adenocarcinoma	16.98
CHT 077 Liver-Colon Mets	11.88
CHT 739 Liver-Colon Mets	12.26
CHT 755 Liver-Colon Mets	21.94
CHT001 Liver-Colon Mets	11.64
CHT 084 Liver-Colon Mets	25.38
CHT 113 Liver-Colon Mets	4.73
CHT 114 Liver-Colon Mets	25.38
CHT 127 Liver-Colon Mets	29.36
CHT 137 Liver-Colon Mets	22.80
CHT 218 Liver-Colon Mets	14.89
CHT 220 Liver-Colon Mets	15.04
CHT 324 Liver-Colon Mets	14.03
CHT 340 Liver-Colon Met	17.28
CHT 530 Liver -Colon Met	13.56
CHT 849 Liver-Colon Met	10.78

WO 03/037257

PCT/US02/34574

CHT 1637 Liver-Colon Met	12.01
CHT131 Liver-Colon Met	15.04
NDR 165 Liver Normal	7.52
NDR 150 Liver Normal	6.39
PIT 236 Liver Normal	3.25

**Table 5:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	CHT 410 Colon N	1.51
2	CHT 425 Colon N	5.74
3	CHT 371 Colon N	1.03
4	PIT 281 Colon N	45.44
5	NDR 211 Colon N	4.73
6	CHT 122 Adenomas	17.10
7	CHT 887 Adenomas	33.38
8	CHT 414 Colonic ACA-B	18.92
9	CHT 841 Colonic ACA-B	20.82
10	CHT 890 Colonic ACA-B	4.20
11	CHT 377 Colonic ACA-B	5.35
12	CHT 520 Colonic ACA-C	4.74
13	CHT 596 Colonic ACA-C	1.16
14	CHT 907 Colonic ACA-C	6.02
15	CHT 372 Colonic ACA-C	9.99
16	NDR 210 Colonic ACA-C	5.98
17	CHT 1365 Colonic ACA-C	5.35
18	CLN 740 Liver N	7.81
19	CLN 741 Liver N	13.79
20	NDR 165 Liver N	6.48
21	NDR 150 Liver N	10.34
22	CHT 1878 Liver N	9.79
23	CHT 119 Col Liver Met	26.10
24	CHT 131 Col Liver Met	13.79
25	CHT 218 Col Liver Met	14.38
26	CHT 739 Col Liver Met	11.84
27	CHT 755 Col Liver Met	10.78
28	CHT 215 Col Abdominal Met	1.12

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**Table 6:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	HCT 116 Aphidi t=0	76
2	HCT 116 Aphidi t=3	86
3	HCT 116 Aphidi t=6	62
4	HCT 116 Aphidi t=9	126
5	HCT 116 Aphidi t=12	83
6	HCT 116 Aphidi t=15	80
7	HCT 116 Aphidi t=18	74
8	HCT 116 Aphidi t=21	92
9	HCT 116 Aphidi t=24	81
10	HCT 116 Noc t=0	149
11	HCT 116 Noc t=3	133
12	HCT 116 Noc t=6	130
13	HCT 116 Noc t=9	68
14	HCT 116 Noc t=15	113
15	HCT 116 Noc t=18	114
16	HCT 116 Noc t=21	153
17	HCT 116 Noc t=24	214
18	DLD noc t=3	180
19	DLD noc t=6	171
20	DLD noc t=9	212
21	DLD noc t=12	239
22	DLD noc t=15	374
23	DLD noc t=18	360
24	DLD noc t=21	151
25	A549 Mimo t=0	93
26	A549 Mimo t=3	108
27	A549 Mimo t=6	125
28	A549 Mimo t=9	147
29	A549 Mimo t=15	76
30	A549 Mimo t=18	68
31	A549 Mimo t=21	73
32	A549 Mimo t=24	68
33	MCF10A Mimo t=0	135
34	MCF10A Mimo t=3	186
35	MCF10A Mimo t=6	113
36	MCF10A Mimo t=9	84

WO 03/037257

PCT/US02/34574

37	MCF10A Mimo t=12	94
38	MCF10A Mimo t=18	108
39	MCF10A Mimo t=21	128
40	MCF10A Mimo t=24	110

Table 7:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	SMAD4-SW480 C	33.61
2	SMAD4-SW480 24HR	42.25
3	SMAD4-SW480 48HR	54.22
4	SMAD4-SW480 72HR	35.16
5	L51747-MUCINOUS	51.83
6	HT29 NON-MUCINOUS	45.75
7	SW620 NON-MUCINOUS	34.67
8	CSC-1 NORMAL	57.91
9	NCM-460 NORMAL	61.64
10	HCT116 RER+	76.68
11	SW48 RER+	303.55
12	SW480 RER-/-	54.22
13	CACO- RER-/-	46.03
14	JDLD-1	227.67
15	JHCT116	123.28
16	DKO1	197.51
17	DKO4	321.97
18	DKS-8	275.48
19	HK93	96.72
20	HKH2	79.66
21	HK2-6	175.56
22	e3Ham#9	73.05
23	APC5 -/-	0.00
24	APC6 -/-	2.00
25	APC1 +/-	0.31
26	APC13 +/-	0.61

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**Table 8:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	JDLD-1	227.87
2	DKO1	197.51
3	DKO4	321.97
4	DKS-8	275.48
5	JHCT116	123.28
6	HK2-6	175.56
7	HKe3	96.72
8	HKh2	79.66
9	e3Ham#9	73.05

**Table 9:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	Normal colon 12-14 weeks	3
2	Normal colon 18-24 weeks	2.9
3	Adenoma 12-14 weeks	5.9
4	Adenoma 18-24 weeks	5.4

5 **Table 10:**

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	HCT 116 Noc t=0	149
2	HCT 116 Noc t=3	133
3	HCT 116 Noc t=6	130
4	HCT 116 Noc t=9	68
6	HCT 116 Noc t=15	113
7	HCT 116 Noc t=18	114
8	HCT 116 Noc t=21	153
9	HCT 116 Noc t=24	214

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, e.g., cancer, including, but not limited to, colon, breast, and lung cancer. The present invention is based, at least in part, on the discovery that a novel member of the protein kinase family molecule, referred to herein as

WO 03/037257

PCT/US02/34574

"20750," is differentially expressed in tumor cells, *e.g.*, colon, lung, and breast tumor cells and in colon cells which have metastasized to the liver, as compared to normal cells.

20750 expression is also upregulated in colon tumors in *Smad3<sup>-/-</sup>* mouse models and in the G2/M phase of HCT-116 human colon adenocarcinoma cell lines, indicating a role for

- 5 20750 in carcinogenesis and cellular proliferation. The *Smad3<sup>-/-</sup>* mouse is a useful and unique model for human colorectal carcinogenesis. *Smad3<sup>-/-</sup>* mice develop colon carcinomas that histopathologically resemble human disease. Samples from several stages of disease progression can be isolated, including normal epithelium, hyperplastic epithelium, adenomatous polyps, and various degrees of primary carcinoma and lymph

10 node metastases.

The 20750 molecule is a member of the protein kinase family and is homologous to MAP/microtubule affinity-regulating kinase-like 1 (MARKL1) (GenBank Accession No.

AB049127). MARKL1 was shown to be regulated by  $\beta$ -catenin in overexpression experiments using the human hepatoma cell line HepG2 (Kato, *et al.* (2001) *Neoplasia*

- 15 3(1):4-9). Expression levels of MARKL1 were later shown to be markedly elevated in 90% of hepatocellular carcinomas.  $\beta$ -catenin functions in the Wnt signaling pathway, which is described in Miller, *et al.* (1999) *Oncogene* 18(55):7860-72 and Peifer (1997) *Science* 275:1752-1753. Signaling by the Wnt family of secreted growth factors represents one of the major developmentally important signaling pathways controlling cell fate

- 20 determination, cellular proliferation, cellular migration, and cell polarity. When there is a decrease in  $\beta$ -catenin degradation and an increase in  $\beta$ -catenin concentration in a cell, through, *e.g.*, phosphorylation, Wnt-signaling is increased, leading to increased cellular proliferation and migration, modified cell polarity, and modified cell-fate determination. Inappropriate activation of the Wnt pathway is implicated in a variety of human cancers, 25 most notably colon cancer. Without intending to be limited by mechanism, it is believed that the 20750 molecules, by modulating  $\beta$ -catenin degradation, modulate the Wnt signaling pathway and therefore modulate cellular growth, cellular proliferation, and tumorigenesis.

- For example, modulation, *e.g.*, inhibition, of 20750 may modulate, *e.g.*, decrease, 30 the stability of  $\beta$ -catenin by decreasing the phosphorylation of  $\beta$ -catenin. Decreased  $\beta$ -catenin concentration in the cell leads to a decrease in Wnt signaling, thereby leading to decreased cellular growth and proliferation. Accordingly, the 20750 molecules of the present invention provide novel diagnostic targets and therapeutic agents for the treatment,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

diagnosis, and prognosis of cellular proliferation disorders, *e.g.*, cancer. In a preferred embodiment, the 20750 molecules of the present invention provide novel diagnostic targets and therapeutic agents for the treatment, diagnosis, and prognosis of colon cancer, lung cancer, and breast cancer.

- 5 As used herein, a “cellular proliferation disorder” includes a disease or disorder that affects a cellular growth, differentiation, or proliferation process. As used herein, a “cellular growth, differentiation or proliferation process” is a process by which a cell increases in number, size or content, by which a cell develops a specialized set of characteristics which differ from that of other cells, or by which a cell moves closer to or  
10 further from a particular location or stimulus. A cellular growth, differentiation, or proliferation process includes amino acid transport and degradation and other metabolic processes of a cell. A cellular proliferation disorder may be characterized by aberrantly regulated cellular growth, proliferation, differentiation, or migration. Cellular proliferation disorders include tumorigenic disease or disorders. As used herein, a “tumorigenic disease  
15 or disorder” includes a disease or disorder characterized by aberrantly regulated cellular growth, proliferation, differentiation, adhesion, or migration, which may result in the production of or tendency to produce tumors. As used herein, a “tumor” includes a normal benign or malignant mass of tissue. Examples of cellular growth or proliferation disorders include, but are not limited to, cancer, *e.g.*, carcinoma, sarcoma, or leukemia, examples of  
20 which include, but are not limited to, colon, ovarian, lung, breast, endometrial, uterine, hepatic, gastrointestinal, prostate, and brain cancer; tumorigenesis and metastasis; skeletal dysplasia; and hematopoietic and/or myeloproliferative disorders.

“Differential expression”, as used herein, includes both quantitative as well as qualitative differences in the temporal and/or tissue expression pattern of a gene. Thus, a  
25 differentially expressed gene may have its expression activated or inactivated in normal versus cellular growth or proliferation disease states. The degree to which expression differs in normal versus cellular growth or proliferation disease states or control versus experimental states need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques, *e.g.*, quantitative PCR, Northern analysis, Taqman™ analysis,  
30 transcriptional profiling, or subtractive hybridization. The expression pattern of a differentially expressed gene may be used as part of a prognostic or diagnostic cellular proliferation disorder evaluation, or may be used in methods for identifying compounds useful for the treatment of cellular proliferation disorder. In addition, a differentially

WO 03/037257

PCT/US02/34574

expressed gene involved in cellular proliferation disorders may represent a target gene such that modulation of the expression level of this gene or the activity of the gene product may act to ameliorate a cellular growth or proliferation disorder. Compounds that modulate target gene expression or activity of the target gene product can be used in the treatment of 5 cellular proliferation disorders. Although the 20750 genes described herein may be differentially expressed with respect to cellular proliferation disorders, and/or their products may interact with gene products important to cellular proliferation disorders, the genes may also be involved in mechanisms important to additional tumor cell processes.

As used interchangeably herein, "20750 activity," "biological activity of 20750" or 10 "functional activity of 20750," includes an activity exerted by a 20750 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on a 20750 responsive cell or tissue, *e.g.*, a tumor cell, or on a 20750 protein substrate, as determined *in vivo*, or *in vitro*, according to standard techniques. 20750 activity can be a direct activity, such as an association with a 20750-target molecule. As used herein, a "substrate" or "target molecule" or "binding partner" is 15 a molecule with which a 20750 protein binds or interacts in nature, such that 20750-mediated function, *e.g.*, modulation of  $\beta$ -catenin degradation or Wnt signaling, is achieved. A 20750 target molecule can be a non-20750 molecule or a 20750 protein or polypeptide. Examples of such target molecules include proteins in the same signaling path as the 20750 protein, *e.g.*, proteins which may function upstream (including both stimulators and 20 inhibitors of activity) or downstream of the 20750 protein in a pathway involving regulation of cellular growth, proliferation or differentiation. Alternatively, a 20750 activity is an indirect activity, such as a cellular signaling activity mediated by interaction of the 20750 protein with a 20750 target molecule. The biological activities of 20750 are described herein. For example, the 20750 proteins can have one or more of the following 25 activities: (1) modulation of the phosphorylation state of 20750 target molecules (*e.g.*, a kinase molecule) or the phosphorylation state of one or more proteins involved in cellular growth, metabolism, or differentiation, *e.g.*, tumor cell growth or differentiation, as described in, for example, Lodish H. *et al.* Molecular Cell Biology, (Scientific American Books Inc., New York, N.Y., 1995) and Stryer L., Biochemistry, (W.H. Freeman, New 30 York), the contents of which are incorporated herein by reference; (2) modulation of the activity of one or more proteins involved in cellular growth or differentiation, *e.g.*, tumor cell growth or differentiation; (3) modulation of expression of one or more genes (*e.g.*, a transcription factor), and (4) modulation of signal transduction. In other preferred

WO 03/037257

PCT/US02/34574

embodiments, the 20750 polypeptides of the present invention have one or more of the following activities: (1) modulation of cancer or tumor progression, (2) modulation of cellular proliferation, (4) modulation of cellular differentiation, (5) modulation of cellular migration, (6) modulation of apoptosis, (7) modulation of cell polarity, (8) modulation of  $\beta$ -catenin stability, *e.g.*, degradation or accumulation in a cell, and (9) modulation of the Wnt signaling pathway.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections:

10 I. Screening Assays:

The invention provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules, ribozymes, or 20750 antisense molecules) which bind to 20750 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on 20750 expression or 20750 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of a 20750 target molecule. Compounds identified using the assays described herein may be useful for treating cellular proliferation disorders.

Candidate/test compounds include, for example, 1) peptides such as soluble peptides, including Ig-tailed fusion peptides and members of random peptide libraries (see, e.g., Lam, K.S. et al. (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten, R. et al. (1991) *Nature* 354:84-86) and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-configuration amino acids; 2) phosphopeptides (*e.g.*, members of random and partially degenerate, directed phosphopeptide libraries, see, *e.g.*, Songyang, Z. et al. (1993) *Cell* 72:767-778); 3) antibodies (*e.g.*, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric, and single chain antibodies as well as Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments of antibodies); and 4) small organic and inorganic molecules (*e.g.*, molecules obtained from combinatorial and natural product libraries).

The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The

WO 03/037257

PCT/US02/34574

biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

10 Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner USP 5,223,409), spores (Ladner USP '409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra*).

Assays that may be used to identify compounds that modulate 20750 activity include assays that determine the ability of 20750 to phosphorylate a target molecule. 20750 activity can be determined by, for example, using an *in vitro* kinase assay. Briefly, a kinase target molecule, *e.g.*,  $\beta$ -catenin, can be incubated with the kinase protein and radioactive ATP, *e.g.*, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, in a buffer containing MgCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, *e.g.*, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 5 mM MnCl<sub>2</sub>. Following the incubation, the immunoprecipitated kinase target molecule can be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, transferred to a membrane, *e.g.*, a PVDF membrane, and autoradiographed. 25 The appearance of detectable bands on the autoradiograph indicates that the kinase substrate has been phosphorylated. Phosphoaminoacid analysis of the phosphorylated substrate can also be performed in order to determine which residues on the kinase substrate are phosphorylated. Briefly, the radiophosphorylated protein band can be excised from the SDS gel and subjected to partial acid hydrolysis. The products can then be separated by one-dimensional electrophoresis and analyzed on, for example, a phosphoimager and compared to ninhydrin-stained phosphoaminoacid standards. 30 Modulation of  $\beta$ -catenin stability can be determined by assaying for phosphorylation of  $\beta$ -

WO 03/037257

PCT/US02/34574

catenin by, for example, methods described in Moon, *et al.*(2001) *Gynecol Oncol*. 81(3)355-9. Modulation of the Wnt signaling pathway can be determined by assaying for β-catenin concentration in the cell as described in, for example, Wong, *et al.*(2001) *Cancer* 92(1):136-145. Other assays that may be used to identify compounds that modulate 20750 activity include assays to determine (1) modulation of the activity of one or more proteins involved in cellular growth or differentiation, *e.g.*, tumor cell growth or differentiation; (2) modulation of expression of one or more genes (*e.g.*, a transcription factor), (3) modulation of signal transduction, (4) modulation of cancer or tumor progression, (5) modulation of cellular proliferation, (6) modulation of cellular differentiation, (7) modulation of cellular migration, (8) modulation of apoptosis, (9) and modulation of cell polarity.

Cellular proliferation assays that may be used to identify compounds that modulate 20750 activity include assays such as the acid phosphatase assay for cell number as described in Connolly *et al.* (1986) *Anal. Biochem.* 152, 136-140 and the MTT assay as described in Loveland, B. E. *et al.*, (1992) *Biochem. Int.*, 27:501-510, which utilizes colorimetric assays to quantitate viable cells, *e.g.*, the cellular reduction of the tetrazolium salt, MTT, to formazan by mitochondrial succinate dehydrogenase. Other assays for cellular proliferation include clonogenic assays, assays for <sup>3</sup>H-thymidine uptake, assays measuring the incorporation of radioactively labeled nucleotides into DNA, or other assays which are known in the art for measuring cellular proliferation. Moreover, inhibition of cellular growth *in vivo*, *e.g.*, in a patient with cancer, can be detected by any standard method for detecting tumors such as by x-ray or imaging analysis of a tumor size, or by observing a reduction in mutant p53 protein production or in the production of any known cell-specific or tumor marker within a biopsy or tissue sample. Determining the ability of a test compound to modulate 20750 activity can be accomplished by monitoring, for example, cell progression through the cell cycle. For example, the cell can be a tumor cell, *e.g.*, a colon tumor cell, a lung tumor cell, or a breast tumor cell.

In one aspect, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 20750 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate 20750 activity is determined. In a preferred embodiment, the biologically active portion of the 20750 protein includes a domain or motif that can modulate amino acid transport or degradation, cellular metabolism, or cellular growth or proliferation. Determining the ability of the test compound to modulate 20750 activity can be accomplished by monitoring, for example, the production of one or

WO 03/037257

PCT/US02/34574

more specific metabolites in a cell which expresses 20750 (see, e.g., Saada *et al.* (2000) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 269: 382-386) or by monitoring cell metabolism, cellular growth, cellular proliferation, or cellular differentiation. The cell, for example, can be of mammalian origin, e.g., a tumor cell such as a lung, breast, or colon tumor cell.

- 5       The ability of the test compound to modulate 20750 binding to a substrate or to bind to 20750 can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate 20750 binding to a substrate can be accomplished, for example, by coupling the 20750 substrate with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the 20750 substrate to 20750 can be determined by detecting the labeled 20750 substrate in a
- 10      complex. Alternatively, 20750 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 20750 binding to a 20750 substrate in a complex. Determining the ability of the test compound to bind 20750 can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to 20750 can be determined by detecting the
- 15      labeled 20750 compound in a complex. For example, 20750 substrates can be labeled with  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ , or  $^3\text{H}$ , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an
- 20      appropriate substrate to product.

It is also within the scope of this invention to determine the ability of a compound to interact with 20750 without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 20750 without the labeling of either the compound or the 20750 molecule (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912). As used herein, a "microphysiometer" (e.g., Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and 20750.

- The ability of a 20750 modulator to modulate, e.g., inhibit or increase, 20750 activity can also be determined through screening assays which identify modulators which either increase or decrease amino acid transport or degradation, cellular metabolism, cellular growth, or cellular proliferation. In one embodiment, the invention provides for a screening assay involving contacting cells which express a 20750 protein or polypeptide

WO 03/037257

PCT/US02/34574

with a test compound, and examining the cells for cellular growth or proliferation. For example, cells expressing a 20750 protein or polypeptide can be contacted with a test compound and subsequently quantitated to measure cellular growth and/or proliferation as described in, for example, Loveland, B. E. *et al.*, (1992) *Biochem. Int.*, 27:501-510, or by

- 5 measuring the incorporation of radioactively labeled nucleotides into DNA, or by measuring the number of cells present compared to a control cell. The number of cells can be measured, for example, by dry/wet weight measurement, by counting the cells via optical density, using a counting chamber, or by using other assays for cellular proliferation as described herein or known in the art.

10 Because 20750 expression is increased in tumors, including metastatic tumors, and is regulated during the cell cycle, compounds which modulate cellular proliferation, growth, and/or differentiation can be identified by the ability to modulate 20750 expression. To determine whether a test compound modulates 20750 expression, a cell which expresses 20750 (*e.g.*, a lung tumor cell, an breast tumor cell, a colon tumor cell, or  
15 a corresponding normal cell) is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 20750 expression can be determined by measuring 20750 mRNA by, *e.g.*, Northern Blotting, quantitative PCR (*e.g.*, Taqman), or *in vitro* transcriptional assays. To perform an *in vitro* transcriptional assay, the full length promoter and enhancer of 20750 can be linked to a reporter gene such as chloramphenicol acetyltransferase (CAT)  
20 or luciferase and introduced into host cells. The same host cells can then be transfected with or contacted with the test compound. The effect of the test compound can be measured by reporter gene activity and comparing it to reporter gene activity in cells which do not contain the test compound. An increase or decrease in reporter gene activity indicates a modulation of 20750 expression and is, therefore, an indicator of the ability of  
25 the test compound to modulate cellular proliferation, growth, and/or differentiation in, *e.g.*, tumor cells.

The above described assay for testing the ability of a test compound to modulate 20750 expression can also be used to test the ability of the 20750 molecule to modulate cellular proliferation. If a test compound can modulate 20750 expression it can most likely  
30 modulate the cellular growth or proliferation, *e.g.*, tumor cellular growth or proliferation.

*In vitro* cell-based models for cancer may also be used to identify compounds that modulate 20750 activity and/or to confirm the ability of the test compound to modulate the activity of a 20750 molecule. For example, cell lines may be transiently or stably

WO 03/037257

PCT/US02/34574

transfected with tumor suppressors and oncogenes, *e.g.*, including, but not limited, to wild type or mutated p53, Smad4, p16, p14, c-myc, and k-ras, which are genes known to be associated with cancer progression or inhibition, *e.g.*, colon, lung, breast, or ovarian cancer progression or inhibition. These cell lines can then be used to evaluate expression or 5 activity of 20750 in the presence or absence of a test compound using the methods described herein. For example, the following human mammary epithelial cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: HMEC, MCF-7, T-47D, ZR-75, MDA-MB-231, MDA-MB-MC-2, MDA-MB-435, BT-549, SkBr3, MDA-MB-468, MCF10A, MCF10AT.cl1, MCF10AT.cl3, MCF10AT1, MCF10AT3B,

10 MCF10CA1.cl, Hs578T, and HCC1937. The following colon cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: HCT-116, SW480, CC-ML3, KM12C, KM12SM, HT29, DLD-1, HCC-2998, COLO-205, HCT-15, SW-620, and KM20L2. The following lung cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in 15 xenograft models in mice: NCI-H345, NCI-H69, and NCI-H125. The following ovarian cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice:

15 SKOV3, SKOV3, OVCAR-3, and OVCAR-4

*In vitro* cell-based models for breast cancer include, for example, the MCF10A cell line transformed with k-ras, a cell-based system of mammary epithelial malignancy; treating human breast epithelial cells (MCF10A) with growth factors, including EGF and 20 IGFl growth factors; and reintroduction of BRCA1 expression into HCC1937 cells.

*In vitro* cell-based models for ovarian cancer include, for example, treatment of the ovarian cancer cell lines, SKOV3 and SKOV3/Variant (which are a variant of the parental SKOV3 ovarian cancer cell line that are cisplatin resistant), with either Epidermal Growth Factor (EGF) or the growth factor Heregulin (Hrg) for 15, 30 and 60 minutes in the 25 absence of serum; and stable expression of p53 in a previously null cell line (SKOV-3 and SKOV3-Var).

*In vitro* cell-based models for lung cancer include, for example, tumor suppressor models such as reintroduction of p53 into NCI-H125 cells, a lung tumor cell line that is null for p53; expression of p16 and p14, distinct tumor suppressors derived from the same 30 genetic locus, both of which are commonly silenced in lung tumors, in the lung tumor cell lines NCI-H460 and A549, which normally lack expression of these genes; and expression of the pRb gene, which is commonly deleted in small cell lung cancer in small cell tumor lines. Other cell-based models include a stably transformed bronchial epithelial cell line

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- with activated k-ras gene. In addition, growth factor models may also be used. For example, NCI-H69 and NCI-H345 small cell lung carcinoma (SCLC) cells may be treated with a substance P analogue (SPA) that acts as a broad spectrum neuropeptide receptor inhibitor. Genes that were downregulated after SPA treatment were flagged for further study to determine if their expression is critical for tumor cell proliferation. SCLC cells that express both the c-kit tyrosine kinase receptor and its ligand, SCF, may be treated with the kinase inhibitor ST1-571. It has been demonstrated that selective growth inhibition upon 571 treatment of cell lines expressing both the receptor and ligand, suggesting that they function in an autocrine feedback loop to stimulate tumor cell proliferation.
- 5      *In vitro* cell-based models for cancer may also be used to identify compounds that modulate 20750 activity and/or to confirm the ability of the test compound to modulate the activity of a 20750 molecule. For example, cell lines may be transiently or stably transfected with tumor suppressors and oncogenes, e.g., including, but not limited, to wild type or mutated p53, Smad4, p16, p14, c-myc, and k-ras, which are genes known to be
- 10     associated with cancer progression or inhibition, e.g., colon, lung, breast, or ovarian cancer progression or inhibition. These cell lines can then be used to evaluate expression or activity of 20750 in the presence or absence of a test compound using the methods described herein. For example, the following human mammary epithelial cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: HMEC, MCF-7, T-47D, ZR-75, MDA-MB-231, MDA-MB-MC-2, MDA-MB-435, BT-549, SkBr3, MDA-MB-468, MCF10A, MCF10AT.cl1, MCF10AT.cl3, MCF10AT1, MCF10AT3B, MCF10CA1.cl, Hs578T, and HCC1937. The following colon cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: HCT-116, SW480, CC-ML3, KM12C, KM12SM, HT29, DLD-1, HCC-2998, COLO-205, HCT-15, SW-620, and
- 15     KM20L2. The following lung cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: NCI-H345, NCI-H69, and NCI-H125. The following ovarian cell lines are available for use in *in vitro* models and/or in xenograft models in mice: SKOV3, SKOV3, OVCAR-3, and OVCAR-4
- 20     *In vitro* cell-based models for breast cancer include, for example, the MCF10A cell line transformed with k-ras, a cell-based system of mammary epithelial malignancy; treating human breast epithelial cells (MCF10A) with growth factors, including EGF and IGF1 growth factors; and reintroduction of BRCA1 expression into HCC1937 cells.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

*In vitro* cell-based models for ovarian cancer include, for example, treatment of the ovarian cancer cell lines, SKOV3 and SKOV3/Variant (which are a variant of the parental SKOV3 ovarian cancer cell line that are cisplatin resistant), with either Epidermal Growth Factor (EGF) or the growth factor Heregulin (Hrg) for 15, 30 and 60 minutes in the absence of serum; and stable expression of p53 in a previously null cell line (SKOV-3 and SKOV3-Var).

*In vitro* cell-based models for lung cancer include, for example, tumor suppressor models such as reintroduction of p53 into NCI-H125 cells, a lung tumor cell line that is null for p53; expression of p16 and p14, distinct tumor suppressors derived from the same genetic locus, both of which are commonly silenced in lung tumors, in the lung tumor cell lines NCI-H460 and A549, which normally lack expression of these genes; and expression of the pRb gene, which is commonly deleted in small cell lung cancer in small cell tumor lines. Other cell-based models include a stably transformed bronchial epithelial cell line with activated k-ras gene. In addition, growth factor models may also be used. For example, NCI-H69 and NCI-H345 small cell lung carcinoma (SCLC) cells may be treated with a substance P analogue (SPA) that acts as a broad spectrum neuropeptide receptor inhibitor. Genes that were downregulated after SPA treatment were flagged for further study to determine if their expression is critical for tumor cell proliferation. SCLC cells that express both the c-kit tyrosine kinase receptor and its ligand, SCF, may be treated with the kinase inhibitor STI-571. It has been demonstrated that selective growth inhibition upon 571 treatment of cell lines expressing both the receptor and ligand, suggesting that they function in an autocrine feedback loop to stimulate tumor cell proliferation.

*In vitro* cell-based models for colon cancer include, for example, SW480 cells stably or transiently transfected with Smad4. Smad4 is a candidate tumor suppressor gene mutated in a subset of colon carcinomas. Smad4 functions in the signal transduction of TGF- $\beta$  molecules. It is well known that the TGF- $\beta$  superfamily is involved in growth inhibition. Smad4 mutation/loss in colon cell lines provides the hypothesis that Smad4 may be a modulator of cell adhesion and invasion. Another cell line useful in the methods of the invention are NCM425 cells stably or transiently transfected with  $\beta$ -catenin. Mutations of the APC gene are responsible for tumor formation in sporadic and familial forms of colorectal cancer. APC binds  $\beta$ -catenin and regulates the cytoplasmic levels of  $\beta$ -catenin. When APC is mutated,  $\beta$ -catenin accumulates in the cytoplasm and translocates

WO 03/037257

PCT/US02/34574

into the nucleus. Once in the nucleus it interacts with LEF/TCF molecules and regulates gene expression. Genes regulated by the  $\beta$ -catenin/LEF complex, like c-myc and cyclin D1, are involved in tumorigenesis. Also useful in the methods of the invention are cells stably or transiently transfected with p53. p53 is a well-known tumor suppressor which is 5 mutated in >50% of colorectal cancer tumors. Still other cell lines useful in the methods of the invention include transient or stable transfections of WISP-1 into NCM425 colon cancer cells, transient or stable transfections of DCC, Cox2, and/or APC into various cells.

Cell lines such as HCT-116 and DLD-1 may also be transformed with k-ras and used in the method of the invention. Point mutations that activate the k-ras oncogene are 10 found in 50% of human colon cancers. Activated k-ras may regulate cell proliferation in colorectal tumors. Disrupting the activated k-ras allele in HCT-116 and DLD-1 cells morphologically alters differentiation, causes loss of anchorage independent growth, slows proliferation in vitro and in vivo and reduces expression of c-myc. Expression of 20750 was found to be downregulated in k-ras disrupted HCT-116 cells.

15 Abnormalities in cell cycle regulation and its checkpoints lead to the development of malignant cells. The loss of a cell's ability to respond to signals that regulate cell proliferation and cell cycle arrest is a common mechanism of cancer. Accordingly, for the study of specific time point within the cell cycle, cell lines such as the colon cancer cell lines HCT116, DLD-1, and NCM425, for example, may be synchronized with agents such 20 as mimosine (G1 block), mimosine (G1/S block) and nocodazole (G2/M block). Cell synchronization in relation to p53 status may also be studied in cells of varying p53 status (SKOV-3 (null), OVCAR-3 or OVCAR-4 (mutant), and HEY (wildtype)).

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay in which a 20750 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test 25 compound and the ability of the test compound to bind to or to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the 20750 protein or biologically active portion thereof is determined. Preferred biologically active portions of the 20750 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-20750 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores. Binding of the 30 test compound to the 20750 protein can be determined either directly or indirectly as described above. Determining the ability of the 20750 protein to bind to a test compound can also be accomplished using a technology such as real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345;

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). As used herein, "BIA" is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIACore). Changes in the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

- In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either 20750 or a 20750 target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a 20750 protein, or interaction of a 20750 protein with a 20750 target molecule in the presence and absence of a test compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes, and microcentrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/20750 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or 20750 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix is immobilized in the case of beads, and complex formation is determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of 20750 binding or activity determined using standard techniques.
- Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either a 20750 protein or a 20750 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 20750 protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which are reactive with 20750 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 20750 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or 20750 protein

WO 03/037257

PCT/US02/34574

is trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 20750 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity

5 associated with the 20750 protein or target molecule.

In yet another aspect of the invention, the 20750 protein or fragments thereof can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *BioTechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993)

10 *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with 20750 ("20750-binding proteins" or "20750-bp) and are involved in 20750 activity. Such 20750-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the 20750 proteins or 20750 targets as, for example, downstream elements of a 20750-mediated signaling pathway. Alternatively, such 20750-binding proteins are likely

15 to be 20750 inhibitors.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for a 20750

20 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a 20750-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close

25 proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene which encodes the protein which interacts with the 20750 protein.

30 In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the assays described herein. For example, a modulating agent can be identified using a cell-based or a cell-free assay, and the ability of the agent to modulate the activity of a 20750 protein can be confirmed *in vivo*, e.g., in an animal such as an animal model for a cellular

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- proliferation disorder, *e.g.*, cancer. Examples of animal models of cancer include transplantable models (*e.g.*, xenografts). Xenografts for colon cancer can be performed with the following cell lines: HCT-116, HT-29, SW-480, SW-620, Colon 26, DLD1, Caco2, colo205, T84, and KM12. Xenografts for lung cancer can be performed with the following cell lines: NCI-H125, NCI-H460, A549, NCI-H69, and NCI-H345. Xenografts for ovarian cancer can be performed with the SKOV3 and HEY cell lines. Xenografts for breast cancer can be performed with, for example, MCF10AT cells, which can be grown as subcutaneous or orthotopic (cleared mammary fat pad) xenografts in mice. MCF10AT xenografts produce tumors that progress in a manner analogous to human breast cancer.
- 10 Estrogen stimulation has also been shown to accelerate tumor progression in this model. MCF10AT xenografted tumors representing stages hyperplasia, carcinoma *in situ*, and invasive carcinoma will be isolated expression profiling. A metastatic subclone of the human breast cancer cell line MDA-MB-231 that metastasizes to brain, lung and bone can also be grown *in vitro* and *in vivo* at various sites (*i.e.* subcutaneously, orthotopically, in
- 15 bone following direct bone injection, in bone following intracardiac injection). MCF-7 and T-47D are other mammary adenocarcinoma cell lines that can be grown as xenografts. All of these cells can be transplanted into immunocompromised mice such as SCID or nude mice, for example.

- Orthotopic metastasis mouse models may also be utilized. For example, the HCT-  
20 116 human colon carcinoma cell line can be grown as a subcutaneous or orthotopic  
xenograft (intracaeal injection) in athymic nude mice. Rare liver and lung metastases can  
be isolated, expanded *in vitro*, and re-implanted *in vivo*. A limited number of iterations of  
this process can be employed to isolate highly metastatic variants of the parental cell line.  
Standard and subtracted cDNA libraries and probes can be generated from the parental and  
25 variant cell lines to identify genes associated with the acquisition of a metastatic  
phenotype. This model can be established using several alternative human colon  
carcinoma cell lines, including SW480 and KM12C.

- Also useful in the methods of the invention are mis-match repair models (MMRs). Hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC), which is caused by germline mutations in  
30 MSH2 & MLH1, genes involved in DNA mismatch repair, accounts for 5-15% of colon  
cancer cases. Mouse models have been generated carrying null mutations in the MLH1,  
MSH2 and MSH3 genes.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Other animal models for cancer include transgenic models (*e.g.*, B66-Min/+ mouse); chemical induction models, *e.g.*, carcinogen (*e.g.*, azoxymethane, 2-dimethylhydrazine, or N-nitrosodimethylamine) treated rats or mice; models of liver metastasis from colon cancer such as that described by Rashidi *et al.* (2000) *Anticancer Res* 20(2A):715; and cancer cell implantation or inoculation models as described in, for example, Fingert *et al.* (1987) *Cancer Res* 46(14):3824-9 and Teraoka *et al.* (1995) *Jpn J Cancer Res* 86(5):419-23. Furthermore, experimental model systems are available for the study of, for example, ovarian cancer (Hamilton, TC *et al.* *Semin Oncol* (1984) 11:285-298; Rahman, NA *et al.* *Mol Cell Endocrinol* (1998) 145:167-174; Beamer, WG *et al.* *Toxicol Pathol* (1998) 26:704-710), gastric cancer (Thompson, J *et al.* *Int J Cancer* (2000) 86:863-869; Fodde, R *et al.* *Cytogenet Cell Genet* (1999) 86:105-111), breast cancer (Li, M *et al.* *Oncogene* (2000) 19:1010-1019; Green, JE *et al.* *Oncogene* (2000) 19:1020-1027), melanoma (Satyamoorthy, K *et al.* *Cancer Metast Rev* (1999) 18:401-405), and prostate cancer (Shirai, T *et al.* *Mutat Res* (2000) 462:219-226; Bostwick, DG *et al.* *Prostate* (2000) 43:286-294). Mouse models for colon cancer include the *APC<sup>min</sup>* mouse, a highly characterized genetic model of human colorectal carcinogenesis; the *APC<sup>1638N</sup>* mouse, which was generated by introducing a PGK-neomycin gene at codon 1638 of the *APC* gene and develops aberrant crypt foci after 6-8 weeks which ultimately progress to carcinomas by 4 months of age; and the *Smad3<sup>-/-</sup>* mouse which develops colon carcinomas that histopathologically resemble human disease.

Other animal based models for studying tumorigenesis *in vivo* are well known in the art (reviewed in Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes, Eliai, H. and Hino, O. (eds.) 1999, *Progress in Experimental Tumor Research*, Vol. 35; Clarke AR *Carcinogenesis* (2000) 21:435-41) and include, for example, carcinogen-induced tumors (Rithideech, K *et al.* *Mutat Res* (1999) 428:33-39; Miller, ML *et al.* *Environ Mol Mutagen* (2000) 35:319-327), as well as animals bearing mutations in growth regulatory genes, for example, oncogenes (*e.g.*, ras) (Arbeit, JM *et al.* *Am J Pathol* (1993) 142:1187-1197; Sinn, E *et al.* *Cell* (1987) 49:465-475; Thorgeirsson, SS *et al.* *Toxicol Lett* (2000) 112-113:553-555) and tumor suppressor genes (*e.g.*, p53) (Vooijs, M *et al.* *Oncogene* (1999) 18:5293-5303; Clark AR *Cancer Metast Rev* (1995) 14:125-148; Kumar, TR *et al.* *J Intern Med* (1995) 238:233-238; Donehower, LA *et al.* (1992) *Nature* 356:215-221).

Furthermore, this invention pertains to uses of novel compounds identified by the above-described screening assays for treatments as described herein. In one embodiment,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

the invention features a method of treating a subject having a cellular growth or proliferation disorder that involves administering to the subject an 20750 modulator such that treatment occurs. In another embodiment, the invention features a method of treating a subject having cancer, *e.g.*, colon cancer, lung cancer, or ovarian cancer, that involves  
5 treating a subject with an 20750 modulator, such that treatment occurs. Preferred 20750 modulators include, but are not limited to, 20750 proteins or biologically active fragments, 20750 nucleic acid molecules, 20750 antibodies, ribozymes, and 20750 antisense oligonucleotides designed based on the 20750 nucleotide sequences disclosed herein, as well as peptides, organic and non-organic small molecules identified as being capable of  
10 modulating 20750 expression and/or activity, for example, according to at least one of the screening assays described herein.

Moreover, a 20750 modulator identified as described herein (*e.g.*, an antisense 20750 nucleic acid molecule, a 20750-specific antibody, or a small molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with  
15 such a modulator. Alternatively, a 20750 modulator identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such a modulator.

Any of the compounds, including but not limited to compounds such as those identified in the foregoing assay systems, may be tested for the ability to ameliorate cellular growth or proliferation disorder symptoms. Cell-based and animal model-based  
20 assays for the identification of compounds exhibiting such an ability to ameliorate cellular growth or proliferation disorder systems are described herein.

In one aspect, cell-based systems, as described herein, may be used to identify compounds which may act to ameliorate cellular growth or proliferation disorder symptoms, for example, reduction in tumor burden, tumor size, tumor cellular growth,  
25 differentiation, and/or proliferation, and invasive and/or metastatic potential before and after treatment. For example, such cell systems may be exposed to a compound, suspected of exhibiting an ability to ameliorate cellular growth or proliferation disorder symptoms, at a sufficient concentration and for a time sufficient to elicit such an amelioration of cellular growth or proliferation disorder symptoms in the exposed cells. After exposure, the cells  
30 are examined to determine whether one or more of the cellular growth or proliferation disorder cellular phenotypes has been altered to resemble a more normal or more wild type, non-cellular growth or proliferation disorder phenotype. Cellular phenotypes that are associated with cellular growth and/or proliferation disorders include aberrant

WO 03/037257

PCT/US02/34574

proliferation, growth, and migration, anchorage independent growth, and loss of contact inhibition.

In addition, animal-based cellular growth or proliferation disorder systems, such as those described herein, may be used to identify compounds capable of ameliorating cellular growth or proliferation disorder symptoms. Such animal models may be used as test substrates for the identification of drugs, pharmaceuticals, therapies, and interventions which may be effective in treating cellular growth or proliferation disorders. For example, animal models may be exposed to a compound, suspected of exhibiting an ability to ameliorate cellular growth or proliferation disorder symptoms, at a sufficient concentration and for a time sufficient to elicit such an amelioration of cellular growth or proliferation disorder symptoms in the exposed animals. The response of the animals to the exposure may be monitored by assessing the reversal of cellular growth or proliferation disorders, or symptoms associated therewith, for example, reduction in tumor burden, tumor size, and invasive and/or metastatic potential before and after treatment.

With regard to intervention, any treatments which reverse any aspect of cellular growth or proliferation disorder symptoms should be considered as candidates for human cellular growth or proliferation disorder therapeutic intervention. Dosages of test compounds may be determined by deriving dose-response curves.

Additionally, gene expression patterns may be utilized to assess the ability of a compound to ameliorate cellular growth and/or proliferation disorder symptoms. For example, the expression pattern of one or more genes may form part of a "gene expression profile" or "transcriptional profile" which may be then be used in such an assessment. "Gene expression profile" or "transcriptional profile", as used herein, includes the pattern of mRNA expression obtained for a given tissue or cell type under a given set of conditions. Such conditions may include, but are not limited to, cellular growth, proliferation, differentiation, transformation, tumorigenesis, metastasis, and carcinogen exposure. Gene expression profiles may be generated, for example, by utilizing a differential display procedure, Northern analysis and/or RT-PCR. In one embodiment, 20750 gene sequences may be used as probes and/or PCR primers for the generation and corroboration of such gene expression profiles.

Gene expression profiles may be characterized for known states within the cell- and/or animal-based model systems. Subsequently, these known gene expression profiles may be compared to ascertain the effect a test compound has to modify such gene

WO 03/037257

PCT/US02/34574

expression profiles, and to cause the profile to more closely resemble that of a more desirable profile.

For example, administration of a compound may cause the gene expression profile of a cellular growth or proliferation disorder model system to more closely resemble the 5 control system. Administration of a compound may, alternatively, cause the gene expression profile of a control system to begin to mimic a cellular growth and/or proliferation disorder state. Such a compound may, for example, be used in further characterizing the compound of interest, or may be used in the generation of additional animal models.

10

II. Predictive Medicine:

The present invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one 15 aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining 20750 protein and/or nucleic acid expression as well as 20750 activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, cells, or tissue, *e.g.*, tumor or carcinoma tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a cellular proliferation disorder. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an 20 individual is at risk of developing a cellular proliferation disorder. For example, mutations in a 20750 gene can be assayed for in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a cellular proliferation disorder.

Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of 20750 25 modulators (*e.g.*, anti-20750 antibodies or 20750 ribozymes) on the expression or activity of 20750 in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

A. Diagnostic Assays For Cellular Proliferation Disorders

To determine whether a subject is afflicted with a cellular proliferation disorder, a 30 biological sample may be obtained from a subject and the biological sample may be contacted with a compound or an agent capable of detecting a 20750 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) that encodes a 20750 protein, in the biological

WO 03/037257

PCT/US02/34574

sample. A preferred agent for detecting 20750 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to 20750 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, the 20750 nucleic acid set forth in SEQ ID NO:1, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 100, 5 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to 20750 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting 20750 protein in a sample is an antibody capable of binding to 20750 protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be 10 polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or F(ab')<sup>2</sup>) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. 15 Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin.

The term "biological sample" is intended to include tissues, cells, and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells, and fluids present within a subject. 20 That is, the detection method of the invention can be used to detect 20750 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of 20750 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of 20750 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and 25 immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of 20750 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of 20750 protein include introducing into a subject a labeled anti-20750 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

30 In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting 20750 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of 20750 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and

WO 03/037257

PCT/US02/34574

comparing the presence of 20750 protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 20750 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

B. Prognostic Assays For Cellular Proliferation Disorders

The present invention further pertains to methods for identifying subjects having or

- 5 at risk of developing a cellular proliferation disorder associated with aberrant 20750 expression or activity.

As used herein, the term "aberrant" includes a 20750 expression or activity which deviates from the wild type 20750 expression or activity. Aberrant expression or activity includes increased or decreased expression or activity, as well as expression or activity  
10 which does not follow the wild type developmental pattern of expression or the subcellular pattern of expression. For example, aberrant 20750 expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the 20750 gene causes the 20750 gene to be under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional 20750 protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, e.g., a  
15 protein which does not interact with a 20750 substrate, or one which interacts with a non-20750 substrate.

- The assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be used to identify a subject having or at risk of developing a cellular proliferation disorder, e.g., cancer, such as for example, colon, lung, and ovarian cancer. A  
20 biological sample may be obtained from a subject and tested for the presence or absence of a genetic alteration. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a 20750 gene, 2) an addition of one or more nucleotides to a 20750 gene, 3) a substitution of one or more nucleotides of a 20750 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 20750 gene, 5) an  
25 alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 20750 gene, 6) aberrant modification of a 20750 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a 20750 gene, 8) a non-wild type level of a 20750-protein, 9) allelic loss of a 20750 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 20750-protein.
- 30 As described herein, there are a large number of assays known in the art which can be used for detecting genetic alterations in a 20750 gene. For example, a genetic alteration in a 20750 gene may be detected using a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g., U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE

WO 03/037257

PCT/US02/34574

PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegren *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in a 20750 gene (see Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). This method includes

5 collecting a biological sample from a subject, isolating nucleic acid (e.g., genomic DNA, mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a 20750 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 20750 gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification

10 product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli, J.C. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional

15 amplification system (Kwoh, D.Y. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. *et al.* (1988) *Bio-Technology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low

20 numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a 20750 gene from a biological sample can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis

25 and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in 20750 can be identified by hybridizing

30 biological sample derived and control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotide probes (Cronin, M.T. *et al.* (1996) *Human Mutation* 7:244-255; Kozal, M.J. *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2:753-759). For example, genetic mutations in 20750 can be identified in two dimensional arrays

WO 03/037257

PCT/US02/34574

containing light-generated DNA probes as described in Cronin, M.T. *et al.* (1996) *supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential, overlapping probes. This step allows for the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows for the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

10 In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the 20750 gene in a biological sample and detect mutations by comparing the sequence of the 20750 in the biological sample with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxam and Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) or Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve, C. W. (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry (see, e.g., PCT International Publication No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; and Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the 20750 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type 20750 sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digest the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated

WO 03/037257

PCT/US02/34574

by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397 and Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

- 5        In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in 20750 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an exemplary embodiment, a probe based on a 20750 sequence, e.g., a wild-type 20750 sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. 10 Patent No. 5,459,039.
- 15      In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 20750 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA*: 20 86:2766; see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 and Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control 20750 nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA 25 fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).
- 20      In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to ensure that it does not

WO 03/037257

PCT/US02/34574

completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 26:12753).

- 5 Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions which permit hybridization only if a perfect match is found (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 86:6230). Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

- 10 Alternatively, allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce 15 polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189). In such cases, ligation will occur only 20 if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

- 25 Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered a 20750 modulator (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule) to effectively treat a 30 cellular proliferation disorder.

C. Monitoring of Effects During Clinical Trials

WO 03/037257

PCT/US02/34574

The present invention further provides methods for determining the effectiveness of a 20750 modulator (*e.g.*, a 20750 modulator identified herein) in treating a cellular proliferation disorder in a subject. For example, the effectiveness of a 20750 modulator in increasing 20750 gene expression, protein levels, or in upregulating 20750 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 20750 gene expression, protein levels, or downregulated 20750 activity. Alternatively, the effectiveness of a 20750 modulator in decreasing 20750 gene expression, protein levels, or in downregulating 20750 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 20750 gene expression, protein levels, or 20750 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 20750 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a cellular proliferation disorder can be used as a "read out" or marker of the phenotype of a particular cell.

For example, and not by way of limitation, genes, including 20750, that are modulated in cells by treatment with an agent which modulates 20750 activity (*e.g.*, identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents which modulate 20750 activity on subjects suffering from a cellular proliferation disorder in, for example, a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of 20750 and other genes implicated in the cellular proliferation disorder. The levels of gene expression (*e.g.*, a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods described herein, or by measuring the levels of activity of 20750 or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent which modulates 20750 activity. This response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent which modulates 20750 activity.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent which modulates 20750 activity (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule identified by the screening assays described herein) including the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a 20750 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from

WO 03/037257

PCT/US02/34574

the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the 20750 protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the 20750 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the 20750 protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or  
5 samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of 20750 to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of 20750 to lower levels than detected, *i.e.* to decrease the  
10 effectiveness of the agent. According to such an embodiment, 20750 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

III. Methods of Treatment of Subjects Suffering From Cellular Proliferation Disorders:

15 The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject, *e.g.*, a human, at risk of (or susceptible to) a cellular proliferation disorder such as cancer, *e.g.*, colon, lung, or ovarian cancer. The term "treatment", as used herein, is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from  
20 patient, who has a disease or disorder, a symptom of a disease or disorder, or a predisposition toward a disease or disorder, with the purpose to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease or disorder, the symptoms of the disease or disorder, or the predisposition toward a disease or disorder, *e.g.*, the cellular proliferation disorder. A therapeutic agent includes, but is not limited to, small  
25 molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.

With regard to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics," as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene  
30 expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers to the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (*e.g.*, a patient's "drug response phenotype", or "drug response genotype").

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an subject's prophylactic or therapeutic treatment with either the 20750 molecules of the present invention or 20750 modulators according to that individual's drug response genotype. Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

A. Prophylactic Methods

In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a cellular proliferation disorder by administering to the subject an agent which modulates 20750 expression or 20750 activity, *e.g.*, modulation of cellular proliferation, *e.g.*, tumor cellular proliferation. Subjects at risk for a cellular proliferation disorder can be identified by, for example, any or a combination of the diagnostic or prognostic assays described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of aberrant 20750 expression or activity, such that a cellular proliferation disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 20750 aberrancy, for example, a 20750, 20750 agonist or 20750 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

20

B. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods for treating a subject suffering from a cellular proliferation disorder. These methods involve administering to a subject an agent which modulates 20750 expression or activity (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described herein), or a combination of such agents. In another embodiment, the method involves administering to a subject a 20750 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 20750 expression or activity. Modulation, *e.g.*, inhibition of 20750 activity is desirable in situations in which 20750 is abnormally upregulated and/or in which decreased 20750 activity is likely to have a beneficial effect, *e.g.*, inhibition of  $\beta$ -catenin degradation, cellular growth, migration and proliferation, thereby ameliorating a cellular proliferation disorder such as cancer, *e.g.*, colon, lung, or breast cancer, in a subject.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

The agents which modulate 20750 activity can be administered to a subject using pharmaceutical compositions suitable for such administration. Such compositions typically comprise the agent (*e.g.*, nucleic acid molecule, protein, or antibody) and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

A pharmaceutical composition used in the therapeutic methods of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can  
5 be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as manitol, sorbitol, and sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays  
10 absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the agent that  
modulates 20750 activity (*e.g.*, a fragment of a 20750 protein or an anti-20750 antibody) in  
the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients  
enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions  
15 are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle which contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above.  
In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying which yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously  
20 sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared  
25 using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth  
30 or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

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

- Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For
- 5 transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are
- 10 formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

The agents that modulate 20750 activity can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

- In one embodiment, the agents that modulate 20750 activity are prepared with
- 15 carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art.
- 20 The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811.
- 25 It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical
- 30 carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the agent that modulates 20750 activity and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an agent for the treatment of subjects.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Toxicity and therapeutic efficacy of such agents can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD<sub>50</sub> (the dose lethal to 50% of the population) and the ED<sub>50</sub> (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is 5 the therapeutic index and can be expressed as the ratio LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Agents which exhibit large therapeutic indices are preferred. While agents that exhibit toxic side effects may be used, care should be taken to design a delivery system that targets such agents to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

10 The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such 20750 modulating agents lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any agent used in the 15 therapeutic methods of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC<sub>50 (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in 20 humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.</sub>

As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (*i.e.*, an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, preferably about 0.01 to 25 mg/kg body weight, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg body weight, and 25 even more preferably about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg, or 5 to 6 mg/kg body weight. The skilled artisan will appreciate that certain factors may influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a 30 therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.

In a preferred example, a subject is treated with antibody, protein, or polypeptide in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, one time per week for between

WO 03/037257

PCT/US02/34574

about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. It will also be appreciated that the effective dosage of antibody, protein, or polypeptide used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment. Changes in dosage may 5 result and become apparent from the results of diagnostic assays as described herein.

The present invention encompasses agents which modulate expression or activity. An agent may, for example, be a small molecule. For example, such small molecules include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic 10 or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per 15 mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds. It is understood that appropriate doses of small molecule agents depends upon a number of factors within the ken of the ordinarily skilled physician, veterinarian, or researcher. The dose(s) of the small molecule will vary, for example, depending upon the identity, size, and condition of the subject or sample being treated, further depending upon the route by which 20 the composition is to be administered, if applicable, and the effect which the practitioner desires the small molecule to have upon the nucleic acid or polypeptide of the invention. Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per kilogram of subject or sample weight (*e.g.*, about 1 microgram per kilogram to about 500 milligrams per kilogram, about 100 micrograms per kilogram to about 5 milligrams per 25 kilogram, or about 1 microgram per kilogram to about 50 micrograms per kilogram). It is furthermore understood that appropriate doses of a small molecule depend upon the potency of the small molecule with respect to the expression or activity to be modulated. Such appropriate doses may be determined using the assays described herein. When one or more of these small molecules is to be administered to an animal (*e.g.*, a human) in order 30 to modulate expression or activity of a polypeptide or nucleic acid of the invention, a physician, veterinarian, or researcher may, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is understood that the specific dose level for any particular animal subject will

WO 03/037257

PCT/US02/34574

depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health, gender, and diet of the subject, the time of administration, the route of administration, the rate of excretion, any drug combination, and the degree of expression or activity to be modulated.

- 5 Further, an antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxyanthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).
- 10 The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, alpha-
- 15 interferon, beta-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.
- 20 Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The
- 5 Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982). Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal
- 10 in U.S. Patent No. 4,676,980.

The nucleic acid molecules used in the methods of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (see, e.g., Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 15 USA 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene

20 delivery system.

#### C. Pharmacogenomics

- In conjunction with the therapeutic methods of the invention, pharmacogenomics (*i.e.*, the study of the relationship between a subject's genotype and that subject's response 25 to a foreign compound or drug) may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer an agent which modulates 30 20750 activity, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with an agent which modulates 20750 activity.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

See, for example, Eichelbaum, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11): 983-985 and Linder, M.W. *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate aminopeptidase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (*e.g.*, a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants). Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high resolution map can be generated from a combination of some ten million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.

Alternatively, a method termed the "candidate gene approach" can be utilized to identify genes that predict drug response. According to this method, if a gene that encodes a drug target is known (*e.g.*, a 20750 protein of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (*e.g.*, N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and the cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation 5 as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic 10 and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as 15 demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Alternatively, a method termed the "gene expression profiling" can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal 20 dosed with a drug (*e.g.*, a 20750 molecule or 20750 modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of a subject. This knowledge, when applied to dosing 25 or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and, thus, enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject suffering from a cellular proliferation disorder with an agent which modulates 20750 activity.

IV. Recombinant Expression Vectors and Host Cells Used in the Methods of the  
30 Invention

The methods of the invention (*e.g.*, the screening assays described herein) include the use of vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a 20750 protein (or a portion thereof). As used herein, the term "vector" refers to a nucleic

WO 03/037257

PCT/US02/34574

acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, which is operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g., tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The

WO 03/037257

PCT/US02/34574

expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., 20750 proteins, mutant forms of 20750 proteins, fusion proteins, and the like).

- 5 The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention can be designed for expression of 20750 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, 20750 proteins can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors), yeast cells, or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel (1990) *supra*. Alternatively, the recombinant expression  
10 vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

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

Purified fusion proteins can be utilized in 20750 activity assays, (e.g., direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 20750 proteins. In a preferred embodiment, a 20750 fusion protein expressed in a  
30 retroviral expression vector of the present invention can be utilized to infect bone marrow cells which are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (e.g., six weeks).

WO 03/037257

PCT/US02/34574

In another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells see chapters 16 and 17 of Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (*e.g.*, tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid).

The methods of the invention may further use a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule which is antisense to 20750 mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen which direct constitutive, tissue specific, or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid, or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes, see Weintraub, H. *et al.*, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to the use of host cells into which a 20750 nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, a 20750 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 20750 nucleic acid molecule containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably

WO 03/037257

PCT/US02/34574

herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

5 A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a 20750 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

10 Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or 15 transfecting host cells can be found in Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), and other laboratory manuals.

A host cell used in the methods of the invention, such as a prokaryotic or 20 eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (i.e., express) a 20750 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a 20750 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding a 20750 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 20750 protein is produced. 25 In another embodiment, the method further comprises isolating a 20750 protein from the medium or the host cell.

#### V. Isolated Nucleic Acid Molecules of the Invention

The coding sequence of the isolated human 20750 cDNA and the predicted amino 30 acid sequence of the human 20750 polypeptide are shown in SEQ ID NOs:1 and 2, respectively.

The methods of the invention include the use of isolated nucleic acid molecules that encode 20750 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- fragments sufficient for use as hybridization probes to identify 20750-encoding nucleic acid molecules (*e.g.*, 20750 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the amplification or mutation of 20750 nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (*e.g.*, cDNA or genomic 5 DNA) and RNA molecules (*e.g.*, mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

- In one embodiment, the 20750 molecules of the present invention include at least one "transmembrane domain." As used herein, the term "transmembrane domain" 10 includes an amino acid sequence of about 20-45 amino acid residues in length which spans the plasma membrane. More preferably, a transmembrane domain includes about at least 20, 25, 30, 35, 40, or 45 amino acid residues and spans the plasma membrane. Transmembrane domains are rich in hydrophobic residues, and typically have an alpha-helical structure. In a preferred embodiment, at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% or 15 more of the amino acids of a transmembrane domain are hydrophobic, *e.g.*, leucines, isoleucines, alanines, valines, phenylalanines, prolines or methionines. Transmembrane domains are described in, for example, Zagotta W.N. *et al.*, (1996) *Annual Rev. Neurosci.* 19: 235-263, the contents of which are incorporated herein by reference. Amino acid residues 214-231 of the human 20750 polypeptide (SEQ ID NO:2) comprise a 20 transmembrane domain.

- To identify the presence of a transmembrane domain in a 20750 protein, and make the determination that a protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein may be subjected to MEMSAT analysis. A MEMSAT analysis of the 20750 protein set forth as SEQ ID NO:2 results in the identification of a transmembrane domain 25 in the amino acid sequence of human 20750 (SEQ ID NO:2) at about residues 130-147 (having a score of 2.9).

- In another embodiment, the 20750 molecules of the present invention include at least one "protein kinase domain". As used herein, the term "protein kinase domain" 30 includes a protein domain having at least about 150-350 amino acid residues and a bit score of at least 150 when compared against a eukaryotic protein kinase domain Hidden Markov Model (HMM), *e.g.*, PFAM Accession Number PF00069. Preferably, a eukaryotic protein kinase domain includes a protein having an amino acid sequence of

WO 03/037257

PCT/US02/34574

about 125-325, 150-300, 190-225 or more preferably about 200 amino acid residues, and a bit score of at least 150, 210, 250 or more preferably, 275.7.

A nucleic acid molecule used in the methods of the present invention, e.g., a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 as a hybridization probe, 20750 nucleic acid molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (e.g., as described in Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Moreover, a nucleic acid molecule encompassing all or a portion of SEQ ID NO:1 can be isolated by the polymerase chain reaction (PCR) using synthetic oligonucleotide primers designed based upon the sequence of SEQ ID NO:1.

15 A nucleic acid used in the methods of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or, alternatively, genomic DNA as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. Furthermore, oligonucleotides corresponding to 20750 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.

20 In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecules used in the methods of the invention comprise the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, or a portion of any of these nucleotide sequences. A nucleic acid molecule which is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, is one which is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 such that it can hybridize to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 thereby forming a stable duplex.

In still another preferred embodiment, an isolated nucleic acid molecule used in the methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is at least about 55%, 59%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to the entire length of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or a portion of any of this nucleotide sequence.

Moreover, the nucleic acid molecules used in the methods of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, for example, a

WO 03/037257

PCT/US02/34574

fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 20750 protein, *e.g.*, a biologically active portion of a 20750 protein. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 75 consecutive nucleotides of a sense sequence of SEQ ID NO:1 of an anti-sense sequence of SEQ ID NO:1 or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1. In one embodiment, a nucleic acid molecule used in the methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is greater than 100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1.

As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences that are significantly identical or homologous to each other remain hybridized to each other. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 70%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85% or 90% identical to each other remain hybridized to each other. Such stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), sections 2, 4 and 6. Additional stringent conditions can be found in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), chapters 7, 9 and 11. A preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions includes hybridization in 4X sodium chloride/sodium citrate (SSC), at about 65-70°C (or hybridization in 4X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 1X SSC, at about 65-70°C. A preferred, non-limiting example of highly stringent hybridization conditions includes hybridization in 1X SSC, at about 65-70°C (or hybridization in 1X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 0.3X SSC, at about 65-70°C. A preferred, non-limiting example of reduced stringency hybridization conditions includes hybridization in 4X SSC, at about 50-60°C (or alternatively hybridization in 6X SSC plus 50% formamide at about 40-45°C) followed by one or more washes in 2X SSC,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

at about 50-60°C. Ranges intermediate to the above-recited values, e.g., at 65-70°C or at 42-50°C are also intended to be encompassed by the present invention. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; 5 washes are performed for 15 minutes each after hybridization is complete. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature ( $T_m$ ) of the hybrid, where  $T_m$  is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length,  $T_m$ (°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 10 49 base pairs in length,  $T_m$ (°C) = 81.5 + 16.6(log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0.41(%G+C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and [Na<sup>+</sup>] is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ([Na<sup>+</sup>] for 1xSSC = 0.165 M). It will also be recognized by the skilled practitioner that additional reagents may be added to hybridization and/or wash buffers to decrease non-specific hybridization of nucleic acid molecules to membranes, for example, 15 nitrocellulose or nylon membranes, including but not limited to blocking agents (e.g., BSA or salmon or herring sperm carrier DNA), detergents (e.g., SDS), chelating agents (e.g., EDTA), Ficoll, PVP and the like. When using nylon membranes, in particular, an additional preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions is hybridization in 0.25-0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7% SDS at about 65°C, followed by one or more 20 washes at 0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% SDS at 65°C, see e.g., Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, (or alternatively 0.2X SSC, 1% SDS).

In preferred embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, e.g., the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for 25 identifying cells or tissue which misexpress a 20750 protein, such as by measuring a level of a 20750-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject e.g., detecting 20750 mRNA levels or determining whether a genomic 20750 gene has been mutated or deleted.

The methods of the invention further encompass the use of nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 due to degeneracy of the 30 genetic code and thus encode the same 20750 proteins as those encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule included in the methods of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

The methods of the invention further include the use of allelic variants of human 20750, *e.g.*, functional and non-functional allelic variants. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 20750 protein that maintain a 20750 activity. Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO:2, or substitution, deletion or insertion of non-critical residues in non-critical regions of the protein.

Non-functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 20750 protein that do not have a 20750 activity. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, deletion, or insertion or premature 10 truncation of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a substitution, insertion or deletion in critical residues or critical regions of the protein.

The methods of the present invention may further use non-human orthologues of the human 20750 protein. Orthologues of the human 20750 protein are proteins that are isolated from non-human organisms and possess the same 20750 activity.

15 The methods of the present invention further include the use of nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or a portion thereof, in which a mutation has been introduced. The mutation may lead to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues or at "essential" amino acid residues. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence 20 of 20750 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO:2) without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the 20750 proteins of the present invention and other members of the protein kinase family are not likely to be amenable to alteration.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 by standard techniques, such as 25 site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids 30 with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains

WO 03/037257

PCT/US02/34574

(e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 20750 protein is preferably replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a 20750 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 20750 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1 the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined using the assay described herein.

Another aspect of the invention pertains to the use of isolated nucleic acid molecules which are antisense to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1. An "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence which is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 20750 coding strand, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a 20750. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding 20750. The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding 20750 disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of 20750 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 20750 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 20750 mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic

WO 03/037257

PCT/US02/34574

ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (*e.g.*, an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between

5 the antisense and sense nucleic acids, *e.g.*, phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. Examples of modified nucleotides which can be used to generate the antisense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil,

10 dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine,

15 uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic

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

The antisense nucleic acid molecules used in the methods of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind

25 to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a 20750 protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An

30 example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention include direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically

WO 03/037257

PCT/US02/34574

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

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

In still another embodiment, an antisense nucleic acid used in the methods of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (e.g., hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave 20750 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of 20750 mRNA. A ribozyme having specificity for a 20750-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a 20750 cDNA disclosed herein (i.e., SEQ ID NO:1). For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a 20750-encoding mRNA. See, e.g., Cech *et al.* U.S. Patent No. 4,987,071; and Cech *et al.* U.S. Patent No. 5,116,742. Alternatively, 20750 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, 20750 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 20750 (e.g., the 20750 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 20750 gene in target cells. See generally, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher, L.J. (1992) *Bioassays* 14(12):807-15.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

In yet another embodiment, the 20750 nucleic acid molecules used in the methods of the present invention can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be 5 modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup B. et al. (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4 (1): 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, e.g., DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for 10 specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup B. et al. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14670-675.

PNAs of 20750 nucleic acid molecules can be used in the therapeutic and 15 diagnostic applications described herein. For example, PNAs can be used as antisense or antigenic agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of 20750 nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (e.g., by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used 20 in combination with other enzymes, (e.g., S1 nucleases (Hyrup B. et al. (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup B. et al. (1996) *supra*; Perry-O'Keefe et al. (1996) *supra*).

In another embodiment, PNAs of 20750 can be modified, (e.g., to enhance their stability or cellular uptake), by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the 25 formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of 20750 nucleic acid molecules can be generated which may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes, (e.g., RNase H and DNA polymerases), to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high 30 binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup B. et al. (1996) *supra*). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup B. et al. (1996) *supra* and Finn P.J. et al.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry and modified nucleoside analogs, e.g., 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA (Mag, M. et al. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn P.J. et al. (1996) *supra*). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (Petersen, K.H. et al. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-1124).
- 10 In other embodiments, the oligonucleotide used in the methods of the invention may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (See, e.g., Krol et al. (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

#### VI. Isolated 20750 Proteins and Anti-20750 Antibodies of the Invention

- The methods of the invention include the use of isolated 20750 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-20750 antibodies. In one embodiment, native 20750 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 20750 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a 20750 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

As used herein, a "biologically active portion" of a 20750 protein includes a fragment of a 20750 protein having a 20750 activity. Biologically active portions of a 20750 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to

WO 03/037257

PCT/US02/34574

or derived from the amino acid sequence of the 20750 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include fewer amino acids than the full length 20750 proteins, and exhibit at least one activity of a 20750 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 20750 protein.

- 5 A biologically active portion of a 20750 protein can be a polypeptide which is, for example, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 215, 250, 300, 350, 400 or more amino acids in length. Biologically active portions of a 20750 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 20750 activity.

In a preferred embodiment, the 20750 protein used in the methods of the invention 10 has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. In other embodiments, the 20750 protein is substantially identical to SEQ ID NO:2, and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail in subsection V above. Accordingly, in another embodiment, the 20750 protein used in the methods of the invention is a protein which 15 comprises an amino acid sequence at least about 50%, 55%, 59%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more identical to SEQ ID NO:2.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for 20 optimal alignment and non-identical sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, or 90% of the length of the reference sequence (*e.g.*, when aligning a second sequence to the 20750 25 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 439 amino acid residues, at least 75, preferably at least 150, more preferably at least 225, even more preferably at least 300, and even more preferably at least 400 or more amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino 30 acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences,

WO 03/037257

PCT/US02/34574

taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available online through the Genetics Computer Group), using either a Blosum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available online through the Genetics Computer Group), using a NWSgapDNA.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In another embodiment, the percent identity between two amino acid or nucleotide sequences is determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0 or 2.0U), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

The methods of the invention may also use 20750 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 20750 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a 20750 polypeptide operatively linked to a non-20750 polypeptide. An "20750 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a 20750 molecule, whereas a "non-20750 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 20750 protein, e.g., a protein which is different from the 20750 protein and which is derived from the same or a different organism. Within a 20750 fusion protein the 20750 polypeptide can correspond to all or a portion of a 20750 protein. In a preferred embodiment, a 20750 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a 20750 protein. In another preferred embodiment, a 20750 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a 20750 protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the 20750 polypeptide and the non-20750 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-20750 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the 20750 polypeptide.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-20750 fusion protein in which the 20750 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 20750.

In another embodiment, this fusion protein is a 20750 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of 20750 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

The 20750 fusion proteins used in the methods of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 20750 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 20750 substrate. Use of 20750 fusion proteins may be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a 20750 protein; (ii) mis-regulation of the 20750 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 20750 protein.

Moreover, the 20750-fusion proteins used in the methods of the invention can be used as immunogens to produce anti-20750 antibodies in a subject, to purify 20750 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 20750 with a 20750 substrate.

Preferably, a 20750 chimeric or fusion protein used in the methods of the invention is produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, for example by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons: 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A 20750-

WO 03/037257

PCT/US02/34574

encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 20750 protein.

- The present invention also pertains to the use of variants of the 20750 proteins which function as either 20750 agonists (mimetics) or as 20750 antagonists. Variants of the 20750 proteins can be generated by mutagenesis, e.g., discrete point mutation or truncation of a 20750 protein. An agonist of the 20750 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 20750 protein. An antagonist of a 20750 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 20750 protein by, for example, competitively modulating a 20750-mediated activity of a 20750 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the 20750 protein.
- In one embodiment, variants of a 20750 protein which function as either 20750 agonists (mimetics) or as 20750 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, e.g., truncation mutants, of a 20750 protein for 20750 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of 20750 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of 20750 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential 20750 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of 20750 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential 20750 variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential 20750 sequences.
- Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

WO 03/037257

PCT/US02/34574

In addition, libraries of fragments of a 20750 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of 20750 fragments for screening and subsequent selection of variants of a 20750 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a 20750 coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which encodes N-terminal, C-terminal and internal fragments of various sizes of the 20750 protein.

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of 20750 proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify 20750 variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6(3):327-331).

The methods of the present invention further include the use of anti-20750 antibodies. An isolated 20750 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind 20750 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A full-length 20750 protein can be used or, alternatively, antigenic peptide fragments of 20750 can be used as immunogens. The antigenic peptide of 20750 comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of 20750 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the 20750 protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more

WO 03/037257

PCT/US02/34574

preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 20750 that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with 5 high antigenicity.

- A 20750 immunogen is typically used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (*e.g.*, rabbit, goat, mouse, or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed 20750 protein or a chemically synthesized 20750 polypeptide. The preparation can further 10 include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic 20750 preparation induces a polyclonal anti-20750 antibody response.

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain 15 an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as a 20750. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind 20750 molecules. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody" 20 composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of 20750. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular 20750 protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-20750 antibodies can be prepared as described above by 25 immunizing a suitable subject with a 20750 immunogen. The anti-20750 antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized 20750. If desired, the antibody molecules directed against 20750 can be isolated from the mammal (*e.g.*, from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A 30 chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the anti-20750 antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol Today* 4:72), the EBV-  
5 hybridoma technique (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques. The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402;  
10 Gefter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a 20750 immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds 20750.  
15 Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-20750 monoclonal antibody (see, e.g., G. Galfré *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; and Kenneth (1980) *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also  
20 would be useful. Typically, the immortal cell line (e.g., a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium  
25 containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells  
30 resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the

WO 03/037257

PCT/US02/34574

invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind 20750, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-20750 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant 5 combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with 20750 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind 20750. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (*e.g.*, the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods 10 and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT 15 International Publication WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554.

25 Additionally, recombinant anti-20750 antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the methods of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in

30 Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.*

WO 03/037257

PCT/US02/34574

European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-555; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

An anti-20750 antibody can be used to detect 20750 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the 20750 protein. Anti-20750 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbellifluorone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycocerythrin; an example of a luminescent material includes luciferin; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  or  $^3\text{H}$ .

25 VII. Electronic Apparatus Readable Media and Arrays

Electronic apparatus readable media comprising a 20750 modulator of the present invention is also provided. As used herein, “electronic apparatus readable media” refers to any suitable medium for storing, holding or containing data or information that can be read and accessed directly by an electronic apparatus. Such media can include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as compact disc; electronic storage media such as RAM, ROM, EPROM, EEPROM and the like; general hard disks and hybrids of these

WO 03/037257

PCT/US02/34574

categories such as magnetic/optical storage media. The medium is adapted or configured for having recorded thereon a marker of the present invention.

As used herein, the term "electronic apparatus" is intended to include any suitable computing or processing apparatus or other device configured or adapted for storing data or information. Examples of electronic apparatus suitable for use with the present invention include stand-alone computing apparatus; networks, including a local area network (LAN), a wide area network (WAN) Internet, Intranet, and Extranet; electronic appliances such as a personal digital assistants (PDAs), cellular phone, pager and the like; and local and distributed processing systems.

10 As used herein, "recorded" refers to a process for storing or encoding information on the electronic apparatus readable medium. Those skilled in the art can readily adopt any of the presently known methods for recording information on known media to generate manufactures comprising the 20750 modulators of the present invention.

15 A variety of software programs and formats can be used to store the marker information of the present invention on the electronic apparatus readable medium. For example, the nucleic acid sequence corresponding to the 20750 modulators can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and MicroSoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like, as well as in  
20 other forms. Any number of dataprocessor structuring formats (*e.g.*, text file or database) may be employed in order to obtain or create a medium having recorded thereon the 20750 modulators of the present invention.

By providing the 20750 modulators of the invention in readable form, one can routinely access the marker sequence information for a variety of purposes. For example,  
25 one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the present invention in readable form to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. Search means are used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

30 The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder, wherein the method comprises the steps of determining the presence or absence of a 20750 modulator and based on the

WO 03/037257

PCT/US02/34574

presence or absence of the 20750 modulator, determining whether the subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to cellular proliferation disorder and/or recommending a particular treatment for the cellular proliferation disorder or pre-cellular proliferation disorder condition.

- 5        The present invention further provides in an electronic system and/or in a network, a method for determining whether a subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder associated with a 20750 modulator wherein the method comprises the steps of determining the presence or absence of the 20750 modulator, and based on the presence or absence of the 20750 modulator, determining  
10      whether the subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder, and/or recommending a particular treatment for the cellular proliferation disorder or pre-cellular proliferation disorder condition. The method may further comprise the step of receiving phenotypic information associated with the subject and/or acquiring from a network phenotypic information associated with the subject.

- 15       The present invention also provides in a network, a method for determining whether a subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder associated with a 20750 modulator, said method comprising the steps of receiving information associated with the 20750 modulator receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network  
20      corresponding to the 20750 modulator and/or cellular proliferation disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 20750 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the cellular proliferation disorder or pre-cellular proliferation disorder condition.

- 25       The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder, said method comprising the steps of receiving information associated with the 20750 modulator, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring  
30      information from the network corresponding to the 20750 modulator and/or cellular proliferation disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 20750 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a cellular proliferation disorder or a pre-disposition to a cellular proliferation disorder. The method

WO 03/037257

PCT/US02/34574

may further comprise the step of recommending a particular treatment for the cellular proliferation disorder or pre-cellular proliferation disorder condition.

The invention also includes an array comprising a 20750 modulator of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In 5 one embodiment, the array can be used to assay gene expression in a tissue to ascertain tissue specificity of genes in the array. In this manner, up to about 7600 genes can be simultaneously assayed for expression. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

In addition to such qualitative determination, the invention allows the quantitation 10 of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression between or among tissues. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can 15 be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. Such a determination is useful, for example, to know the effect of cell-cell interaction at the level of gene expression. If an agent is administered therapeutically to treat one cell type but has an undesirable effect on another cell type, the invention provides an assay to determine the molecular basis of the 20 undesirable effect and thus provides the opportunity to co-administer a counteracting agent or otherwise treat the undesired effect. Similarly, even within a single cell type, undesirable biological effects can be determined at the molecular level. Thus, the effects of an agent on expression of other than the target gene can be ascertained and counteracted.

In another embodiment, the array can be used to monitor the time course of 25 expression of one or more genes in the array. This can occur in various biological contexts, as disclosed herein, for example development of cellular proliferation disorder, progression of cellular proliferation disorder, and processes, such a cellular transformation associated with cellular proliferation disorder.

The array is also useful for ascertaining the effect of the expression of a gene on the 30 expression of other genes in the same cell or in different cells. This provides, for example, for a selection of alternate molecular targets for therapeutic intervention if the ultimate or downstream target cannot be regulated.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

The array is also useful for ascertaining differential expression patterns of one or more genes in normal and abnormal cells. This provides a battery of genes that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

This invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application and the Sequence Listing are incorporated herein by reference.

#### EXAMPLES

10 **EXAMPLE 1: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  
HUMAN20750 cDNA**

In this example, the identification and characterization of the gene encoding human 20750 is described.

15 **Isolation of the human 20750 cDNA**

The invention is based, at least in part, on the discovery of a human gene encoding a novel polypeptide, referred to herein as human 20750. The entire sequence of the human clone 55053 was determined and found to contain an open reading frame termed human "20750." The nucleotide sequence of the human 20750 gene is set forth in the Sequence Listing as SEQ ID NO:1. The amino acid sequence of the human 20750 expression product is set forth in the Sequence Listing as SEQ ID NO: 2. The 20750 polypeptide comprises about 439 amino acids. The coding region (open reading frame) of SEQ ID NO:1 is set forth as SEQ ID NO:3.

25 **Analysis of the human 20750 Molecules**

A search using the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 was performed against the HMM database in PFAM resulting in the identification of a protein kinase domain in the amino acid sequence of human 20750 at about residues 1-201 of SEQ ID NO:2 (score = 275.7).

30 A search using the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2 was also performed against the Memsat database, resulting in the identification of a potential transmembrane domain (score = 2.9) in the amino acid sequence of human 20750 (SEQ ID NO:2) at about residues 130-147.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Searches of the amino acid sequence of human 20750 were further performed against the Prosite database. These searches resulted in the identification in the amino acid sequence of human 20750 of five potential cAMP/cGMP-dependant protein kinase phosphorylation sites (ProSite Acc. No. PS00004) at about residues 188-191, 224-227, 260-263, 277-280, and 394-397 of SEQ ID NO:2. A glycosaminoglycan attachment site (ProSite Acc. No. PS00002) was also identified at about residues 350-353. Eleven potential protein kinase C phosphorylation sites (ProSite Acc. No. PS00005) were identified at about residues 18-20, 276-278, 284-286, 289-291, 305-307, 333-335, 375-377, 389-391, 393-395, 430-432, and 435-437 of SEQ ID NO:2. Two potential N-myristoylation sites (ProSite Acc. No. PS00008) were identified at about residues 237-242 and 349-354 of SEQ ID NO:2. Two amidation sites (ProSite Acc. No. PS00009) were identified at about residues 119-122 and 222-225 of SEQ ID NO:2. Three potential casein kinase II phosphorylation sites (ProSite Acc. No. PS00006) were identified at about residues 30-33, 101-104, and 172-175 of SEQ ID NO:2. A Serine/threonine protein kinase active site signature (ProSite Acc. No. PS00108) was identified at about residues 68-80 of SEQ ID NO:2.

The amino acid sequence of human 20750 was analyzed using the program PSORT to predict the localization of the proteins within the cell. This program assesses the presence of different targeting and localization amino acid sequences within the query sequence. The results of the analyses show that human 20750 may be localized to the cytoplasm, nucleus, or peroxisomes.

Further homologies of interest, including possible kinase-related domains, were identified by using the amino acid sequence of 20750 (SEQ ID NO:2) to search the ProDom database (available online through the ProDom (Protein Domain Database) website).

**EXAMPLE 2: Tissue Distribution of 20750 mRNA using Taqman™ analysis**

This example describes the tissue distribution of human 20750 mRNA in a variety of cells and tissues, as determined using the TaqMan™ procedure. The Taqman™ procedure is a quantitative, reverse transcription PCR-based approach for detecting mRNA. The RT-PCR reaction exploits the 5' nuclease activity of AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase to cleave a TaqMan™ probe during PCR. Briefly, cDNA was generated from the samples of interest, including, for example, lung, ovary, breast, and colon tumor

WO 03/037257

PCT/US02/34574

samples, and normal samples, and used as the starting material for PCR amplification. In addition to the 5' and 3' gene-specific primers, a gene-specific oligonucleotide probe (complementary to the region being amplified) was included in the reaction (*i.e.*, the Taqman™ probe). The TaqMan™ probe includes the oligonucleotide with a fluorescent reporter dye covalently linked to the 5' end of the probe (such as FAM (6-carboxyfluorescein), TET (6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein), JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein), or VIC) and a quencher dye (TAMRA (6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) at the 3' end of the probe.

During the PCR reaction, cleavage of the probe separates the reporter dye and the quencher dye, resulting in increased fluorescence of the reporter. Accumulation of PCR products is detected directly by monitoring the increase in fluorescence of the reporter dye. When the probe is intact, the proximity of the reporter dye to the quencher dye results in suppression of the reporter fluorescence. During PCR, if the target of interest is present, the probe specifically anneals between the forward and reverse primer sites. The 5'-3' nucleolytic activity of the AmpliTaq™ Gold DNA Polymerase cleaves the probe between the reporter and the quencher only if the probe hybridizes to the target. The probe fragments are then displaced from the target, and polymerization of the strand continues. The 3' end of the probe is blocked to prevent extension of the probe during PCR. This process occurs in every cycle and does not interfere with the exponential accumulation of product. RNA was prepared using the trizol method and treated with DNase to remove contaminating genomic DNA. cDNA was synthesized using standard techniques. Mock cDNA synthesis in the absence of reverse transcriptase resulted in samples with no detectable PCR amplification of the control gene confirms efficient removal of genomic DNA contamination.

A human panel comprising normal and tumorigenic tissues indicated broad distribution of human 20750 expression, with highest expression in normal brain cortex tissue and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (see Table 1). Importantly, as shown in Table 1, human 20750 expression was increased 3-fold in colon tumor samples and lung tumor samples as compared to normal colon tissue samples and normal lung tissue samples.

A xenograft panel comprising breast, colon, lung and ovarian cancer cell lines as well as 293 and 293T cell lines was also tested. As shown in Table 2, expression of

WO 03/037257

PCT/US02/34574

human 20750 was detected in cell lines of all origins, *e.g.*, including colon, breast, and lung cancer cell lines.

An oncology human panel comprising normal and solid tumor samples indicated a 7-fold to 10-fold overexpression of human 20750 in breast, lung, and colon tumor samples 5 as compared to normal breast, lung, and colon samples (see Table 3).

A panel comprising normal colon samples, early stage adenocarcinomas samples, colon to liver metastasis samples, and normal liver samples was also tested. As shown in Table 4, human 20750 is overexpressed in 95% of colon to liver metastasis samples.

An expanded colon panel comprising samples from various stages of colon cancer 10 including stage B adenocarcinoma samples, stage C adenocarcinoma samples, adenoma samples, colon to liver metastasis samples, abdominal colon metastasis samples, normal colon samples, and normal liver samples was also tested (see Table 5). Results showed overexpression in colon to liver metastasis samples and significant expression in adenomas and stage A primary tumors.

15 An *in vitro* synchronized cell cycle panel was also tested (see Table 6). Expression of human 20750 was tested in several cell cycle regulated cancer cell lines at various time points. Abnormalities in cell cycle regulation and its checkpoints lead to the development of malignant cells. The loss of a cell's ability to respond to signals that regulate cell proliferation and cell cycle arrest is a common mechanism by which cancer develops. By 20 synchronizing cell lines with drugs which cause cell cycle arrest, time points can be profiled to identify genes which are regulated in various stages of the cell cycle. Rapidly replicating human cells progress through the full cell cycle in about 24 hours (mitosis takes about 30 minutes, G1 takes about 9 hours, the S phase takes about 10 hours, and the G2 phase takes about 4.5 hours). Expression of human 20750 was tested at various time 25 points in several cancer cell lines which were synchronized and induced to enter the cell cycle. Results show 20750 expression at all time points and increased 20750 expression in human adenocarcinoma DLD-1 cells.

A panel comprising cells from *in vitro* oncogene cell models was also tested. These oncogene cell models comprise cell lines transiently and stably transfected with 30 tumor suppressors and oncogenes known to be associated with cancer progression, *e.g.*, colon cancer progression. As shown in Tables 7 and 8, human 20750 is expressed in these various cancer cell models.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

- 20750 expression was also analyzed in a *Smad3*<sup>-/-</sup> mouse model. The *Smad3*<sup>-/-</sup> mouse is a useful and unique model for human colorectal carcinogenesis. *Smad3*<sup>-/-</sup> mice develop colon carcinomas that histopathologically resemble human disease. Samples from several stages of disease progression can be isolated, including normal epithelium,
- 5 hyperplastic epithelium, adenomatous polyps, and various degrees of primary carcinoma and lymph node metastases. Expression of human 20750 in normal colon samples and adenoma samples at 12-14 weeks and 18-24 weeks was investigated. Results are shown in Table 9 and indicate that 20750 expression is upregulated in early and late stage tumors as compared to normal colon tissue.
- 10 Analysis of 20750 expression in cell cycle regulated HCT-116 human colon carcinoma cells treated with Nocodazole was also investigated. Nocodazole regulates the cell cycle in G2/M phase. Results show that human 20750 expression is upregulated during the G2/M phase of the cell cycle in these cells (see Table 10), indicating 20750 expression during cell proliferation.
- 15 The foregoing data reveal a significant up-regulation of 20750 mRNA in carcinomas, in particular colon carcinomas, colon metastases to the liver, breast carcinomas, and lung carcinomas. Moreover, these data link the expression of 20750 with cellular proliferation. Given that 20750 is expressed in a variety of tumors, with significant up-regulation in tumor samples as compared to normal samples, and that 20750
- 20 is expressed during cellular proliferation, it is believed that inhibition of 20750 activity may inhibit tumor formation or progression, especially in colon, breast, or lung tumors.

**EXAMPLE 3: Tissue Distribution of 20750 mRNA using In Situ analysis**

- 25 For *in situ* analysis, various tissues, e.g., tissues obtained from normal colon, liver, breast, and lung and colon, breast, and lung tumors, and colon metastases to the liver were first frozen on dry ice. Ten-micrometer-thick sections of the tissues were post-fixed with 4% formaldehyde in DEPC treated 1X phosphate-buffered saline at room temperature for 10 minutes before being rinsed twice in DEPC 1X phosphate-buffered saline and once in
- 30 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0). Following incubation in 0.25% acetic anhydride-0.1 M triethanolamine-HCl for 10 minutes, sections were rinsed in DEPC 2X SSC (1X SSC is 0.15M NaCl plus 0.015M sodium citrate). Tissue was then dehydrated through a series of

WO 03/037257

PCT/US02/34574

ethanol washes, incubated in 100% chloroform for 5 minutes, and then rinsed in 100% ethanol for 1 minute and 95% ethanol for 1 minute and allowed to air dry.

Hybridizations were performed with  $^{35}\text{S}$ -radiolabeled ( $5 \times 10^7$  cpm/ml) cRNA probes. Probes were incubated in the presence of a solution containing 600 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.01% sheared salmon sperm DNA, 0.01% yeast tRNA, 0.05% yeast total RNA type X1, 1X Denhardt's solution, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 100 mM dithiothreitol, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.1% sodium thiosulfate for 18 hours at 55°C.

After hybridization, slides were washed with 2X SSC. Sections were then sequentially incubated at 37°C in TNE (a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 500 mM NaCl, and 1 mM EDTA), for 10 minutes, in TNE with 10 $\mu\text{g}$  of RNase A per ml for 30 minutes, and finally in TNE for 10 minutes. Slides were then rinsed with 2X SSC at room temperature, washed with 2X SSC at 50°C for 1 hour, washed with 0.2X SSC at 55°C for 1 hour, and 0.2X SSC at 60°C for 1 hour. Sections were then dehydrated rapidly through serial ethanol-0.3 M sodium acetate concentrations before being air dried and exposed to Kodak Biomax MR scientific imaging film for 24 hours and subsequently dipped in NB-2 photoemulsion and exposed at 4°C for 7 days before being developed and counter stained.

*In situ* hybridization results indicated expression of 20750 in one of four normal colon tissue samples tested, six of six colon tumor samples tested, five of five liver metastasis to the liver samples tested, and in two of two normal liver samples tested. Moderate to strong expression in primary colon tumor samples and metastatic carcinoma samples was also observed. Normal liver samples and normal colon samples show modest expression of 20750 as compared to colon tumor samples. Results further indicate expression of 20750 in two of two normal breast tissue samples tested and in four of four breast tumor tissue samples tested with modest expression in normal ductal epithelium as compared to breast tumor tissue. Results also indicate moderate to strong expression in four of four lung tumor tissues tested and two of two normal lung tissues tested.

These results, which confirm the expression pattern shown by Taqman analysis described above, indicate widespread expression of 20750 in most tumor types. 20750 is differentially expressed in colon tumors and liver metastases as compared to normal colon and liver tissue; in breast tumors as compared to normal breast tissue; and in lung tumors

WO 03/037257

PCT/US02/34574

as compared to normal lung tissue. Therefore, inhibition of 20750 may inhibit tumor progression or formation, especially in colon tumors.

**EXAMPLE 4: EXPRESSION OF RECOMBINANT 20750 PROTEIN IN  
5 BACTERIAL CELLS**

In this example, human 20750 is expressed as a recombinant glutathione-S-transferase (GST) fusion polypeptide in *E. coli* and the fusion polypeptide is isolated and characterized. Specifically, 20750 is fused to GST and this fusion polypeptide is expressed in *E. coli*, e.g., strain PEB199. Expression of the GST-20750 fusion protein in 10 PEB199 is induced with IPTG. The recombinant fusion polypeptide is purified from crude bacterial lysates of the induced PEB199 strain by affinity chromatography on glutathione beads. Using polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the polypeptide purified from the bacterial lysates, the molecular weight of the resultant fusion polypeptide is determined.

15

**EXAMPLE 5: EXPRESSION OF RECOMBINANT 20750 PROTEIN IN COS  
CELLS**

To express the human 20750 gene in COS cells, the pcDNA/Amp vector by Invitrogen Corporation (San Diego, CA) is used. This vector contains an SV40 origin of 20 replication, an ampicillin resistance gene, an *E. coli* replication origin, a CMV promoter followed by a polylinker region, and an SV40 intron and polyadenylation site. A DNA fragment encoding the entire 20750 protein and an HA tag (Wilson *et al.* (1984) *Cell* 37:767) or a FLAG tag fused in-frame to its 3' end of the fragment is cloned into the polylinker region of the vector, thereby placing the expression of the recombinant protein 25 under the control of the CMV promoter.

To construct the plasmid, the 20750 DNA sequence is amplified by PCR using two primers. The 5' primer contains the restriction site of interest followed by approximately twenty nucleotides of the 20750 coding sequence starting from the initiation codon; the 3' end sequence contains complementary sequences to the other restriction site of interest, a 30 translation stop codon, the HA tag or FLAG tag and the last 20 nucleotides of the 20750 coding sequence. The PCR amplified fragment and the pCDNA/Amp vector are digested with the appropriate restriction enzymes and the vector is dephosphorylated using the CIAP enzyme (New England Biolabs, Beverly, MA). Preferably the two restriction sites

WO 03/037257

PCT/US02/34574

chosen are different so that the 20750 gene is inserted in the correct orientation. The ligation mixture is transformed into *E. coli* cells (strains HB101, DH5 $\alpha$ , SURE, available from Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, can be used), the transformed culture is plated on ampicillin media plates, and resistant colonies are selected. Plasmid DNA is isolated from transformants and examined by restriction analysis for the presence of the correct fragment.

COS cells are subsequently transfected with the 20750-pCDNA/Amp plasmid DNA using the calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation methods, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Other suitable methods for 10 transfecting host cells can be found in Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989. The expression of the 20750 polypeptide is detected by radiolabelling ( $^{35}$ S-methionine or  $^{35}$ S-cysteine available from NEN, Boston, MA, can be used) and immunoprecipitation (Harlow, E. and 15 Lane, D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988) using an HA specific monoclonal antibody. Briefly, the cells are labeled for 8 hours with  $^{35}$ S-methionine (or  $^{35}$ S-cysteine). The culture media are then collected and the cells are lysed using detergents (RIPA buffer, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% DOC, 50 mM Tris, pH 7.5). Both the cell lysate and the culture media 20 are precipitated with an HA-specific monoclonal antibody. Precipitated polypeptides are then analyzed by SDS-PAGE.

Alternatively, DNA containing the 20750 coding sequence is cloned directly into the polylinker of the pCDNA/Amp vector using the appropriate restriction sites. The resulting plasmid is transfected into COS cells in the manner described above, and the 25 expression of the 20750 polypeptide is detected by radiolabelling and immunoprecipitation using an 20750 specific monoclonal antibody.

#### Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than 30 routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

## What is claimed:

1. A method for identifying a compound capable of treating a cell proliferation disorder, comprising assaying the ability of the compound to modulate 20750 nucleic acid expression or 20750 polypeptide activity, thereby identifying a compound capable of treating a cell proliferation disorder.
2. A method for identifying a compound capable of modulating cellular proliferation comprising:
  - 10 a) contacting a cell which expresses 20750 with a test compound; and b) assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 20750 nucleic acid or the activity of a 20750 polypeptide, thereby identifying a compound capable of modulating cellular proliferation.
- 15 3. A method for modulating cellular proliferation in a cell comprising contacting a cell with a 20750 modulator, thereby modulating cellular proliferation in the cell.
4. The method of claim 2, wherein the cell is a breast cell, a lung cell  
20 or a colon cell.
5. The method of claim 3, wherein the 20750 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
- 25 6. The method of claim 3, wherein the 20750 modulator is capable of modulating 20750 polypeptide activity.
7. The method of claim 6, wherein the 20750 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.  
30
8. The method of claim 6, wherein the 20750 modulator is capable of modulating 20750 nucleic acid expression.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

9. A method for treating a subject having a cell proliferation disorder characterized by aberrant 20750 polypeptide activity or aberrant 20750 nucleic acid expression comprising administering to the subject a 20750 modulator, thereby treating said subject having a cell proliferation disorder.

5

10. The method of claim 9, wherein said cell proliferation disorder is selected from the group consisting of breast cancer, lung cancer and colon cancer.

11. The method of claim 9, wherein said 20750 modulator is administered in a pharmaceutically acceptable formulation.

12. The method of claim 9, wherein the 20750 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

15 13. The method of claim 9, wherein the 20750 modulator is capable of modulating 20750 polypeptide activity.

WO 03/037257

PCT/US02/34574

**SEQUENCE LISTING**

<110> Williamson, Mark

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE  
DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS  
USING 20750

<130> MPI01-275

<150> 60/335,006  
<151> 2001-10-31

<160> 3

<170> FastSEO for Windows Version 4.0

<210> 1

<210> 1  
<211> 1594

<212> DNA

```

<400> 1
aaaggccgtt cctggttccag ccgtlccctg ggtgccgtt gccggaaactc tatcgcttc 60
tgccctgagg aaccaaaaaaaa tgigggcaac tataggctgc taaggaccat cggeaaaggcc 120
aaccttcggcc aactgtcaag gcttcggcat atccatggc taatccacgg cgccccgggtt cgcttataag 180
atccatggaa agaccccaatg gaaaccccaatg agcttgcga agctgttcag aagaatccgg 240
atccatggaa gacttcggatc cccaaacatc gtggatggat ttggatgtca agagacgggg 300
aaggacgtt acatgttgtat ggtatgtca cgccggatgg aatgttttgc ttacccctgttgc 360
tcggccggcc ggtatggaa gaaggatggct cgaggccatgt tccggatgt ctgttcggcc 420
tgctcaactt gtccatggaaa gaaatcttgcg aacatggatca caggatggc taaaaggcgtt aaaaatctgtt 480
ctggatggcc agggccaaatc caaaatcgcc gacttgcgtt tcgcaatgtt gttcacgttgc 540
ggctccaaatc tgccatggat ctgttggggc cccatccatc cgcccccggc gtgttccgg 600
ggccaaatgg atgtatggcc agatgttgcac atgttgcggc ttggatgtca tttgttgcgtt 660
ctggatggcc ctggatggcc ctggatggat cacaatccca agggatgtcc ggatggatgttgc 720
ctcggatggaa agttatggccctt ccccttgcgtt atgttgcac atctggatggatgttgc 780
agatgttccg tgcttgaaatc cccaaatccca tgcgttgcgtt agcaatggatca taatggacaaa 840
tggtatccatc tgccatggatca ggggttggggc tgatggccggc acacggatgttgc cttatggatgttgc 900
cggtatggcc ctggatggcc agatgttgcgtt cggatgttgcgtt gtggatgttgc aggttgcgttgc 960
ccctttccatc ctatgttgcgtt cagttgcggcc cccatccatc aatggatgttgc cccttgcggcc 1020
cgaaatggaa gcaatggatcc acatgttgcgtt cttcccccggc gatgttgcgtt cccggatgttgc 1080
acatcttgcgtt gcaatggatcc accatggatcc gaaatggatcc tggatgttgcgtt aatgttgcgtt 1140
aaaaatgttgcgtt cccggatgttgcgtt cccatccatc gatgttgcgtt cttcccccggc tggatgttgc 1200
ccccccatccatc gggatgttgcgtt cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1260
ggggggatggatcc tggatgttgcgtt cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1320
ccccccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1380
ccccccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1440
ctggatggatcc tggatgttgcgtt cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1500
acccggatgttgcgtt gggatgttgcgtt atccatggatcc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1560
tgaggccctt atccatggatcc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc cccatccatc 1594

```

<210> 2  
<211> 439  
<212> PRT  
<213> Homo sapien

```

<400> 2
Met Lys Gly Leu Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val Ile
      5           10          15
Glu Thr Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala Gly

```

WO 03/037257

PCT/US02/34574

20                        25                        30  
 Glu Val Phe Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys Glu  
 35                        40                        45  
 Ala Arg Ala Lys Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys His  
 50                        55                        60  
 Gln Lys Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu  
 65                        70                        75                        80  
 Asp Ala Glu Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn Glu  
 85                        90                        95  
 Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro Tyr  
 100                      105                      110  
 Ala Ala Pro Glu Leu Phe Gln Gly Lys Tyr Asp Gly Pro Glu Val  
 115                      120                      125  
 Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly Ser  
 130                      135                      140  
 Leu Pro Phe Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val Leu  
 145                      150                      155                        160  
 Arg Gly Lys Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu Ser  
 165                      170                      175  
 Ile Leu Arg Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr Leu  
 180                      185                      190  
 Glu Gln Ile Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly Glu  
 195                      200                      205  
 Glu Leu Lys Pro Asp Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly Arg  
 210                      215                      220  
 Lys Ala Ser Cys Ser Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro Pro  
 225                      230                      235                        240  
 Ser Ser Pro Met Val Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu Ile  
 245                      250                      255  
 Pro Glu Arg Arg Lys Asp Ser Thr Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro Pro  
 260                      265                      270  
 Ser Met Met Thr Arg Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro Gly  
 275                      280                      285  
 Ser Glu Arg Pro Ser Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser Gly  
 290                      295                      300  
 Thr Ser Arg Val Pro Pro Ala Ser Pro Ser Ser His Ser Leu Ala Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Pro Ser Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg Ser  
 325                      330                      335                      340  
 Thr Phe His Gly Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ser  
 340                      345                      350  
 Gly Gly Gly Val Gln Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala His  
 355                      360                      365  
 Glu Ala Ala Pro Leu Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn Leu  
 370                      375                      380                      385  
 Phe Thr Lys Leu Thr Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Asp Glu Pro  
 395                      400  
 Glu Arg Ile Gly Gly Pro Glu Val Thr Ser Cys His Leu Pro Trp Asp  
 405                      410                      415  
 Lys Thr Glu Thr Ala Pro Arg Leu Leu Arg Phe Pro Trp Ser Val Lys  
 420                      425                      430  
 Leu Thr Ser Ser Arg Pro Ser  
 435

<210> 3  
 <211> 1594  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapien

&lt;220&gt;

WO 03/037257

PCT/US02/34574

<221> CDS  
<222> (244)...(1563)

<400> 3  
aaaggccgt cctggtecaag ccgttccctg ggtggccgtt gcccgaactc tatcgcttcc 60  
tgcctgagg aacaacccca tgfgggcaac tataggctgc taaggacat cgggaaggcc 120  
aacttcgcca aagtcaagct ggctcgccat atcctcacgg gcccggaggt cgctattaaq 180  
atccatgtata agaccccgat gaaccccaagt agtttcaga agctgttcag agaaatccga 240  
att atg aag gga ctc aac cac ccc aac att gtg aag ctt ttt gag gtg 288  
Met Lys Gly Ile Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Phe Glu Val  
1 5 10 15  
ata gag acg gag aag acg cta tac ctg gtg atg gaa tac gct agc gca 336  
Ile Glu Thr Glu Lys Thr Leu Tyr Leu Val Met Glu Tyr Ala Ser Ala  
20 25 30  
gga gaa gtg ttt gac tac ctc gtg tcg cac ggc cgc atg aag gag aag 384  
Gly Glu Val Phe Asp Tyr Leu Val Ser His Gly Arg Met Lys Glu Lys  
35 40 45  
gag gct cga gcc aag ttc cgg cag atc gtg tca gcc gtg cac tac tgt 432  
Glu Ala Arg Ala Lys Phe Arg Gln Ile Val Ser Ala Val His Tyr Cys  
50 55 60  
cat cag aag aac att gta cac agg gat cta aag gct gaa aac ctg ttg 480  
His Gin Lys Asn Ile Val His Arg Asp Leu Lys Ala Glu Asn Leu Leu  
65 70 75  
ctg gat gcc gag aac atc aaa atc gcc gac ttc ggc ttc agc sat 528  
Leu Asp Ala Glu Ala Asn Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Phe Ser Asn  
80 85 90 95  
gag ttc acg ctg ggc tcc aag ctg gac acc ttc tgt ggg agc ccc cca 576  
Glu Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Asp Thr Phe Cys Gly Ser Pro Pro  
100 105 110  
tac gcc gcc cca gag ctg ttc cag ggc aag aag tat gat ggg cca gag 624  
Tyr Ala Ala Pro Glu Leu Phe Gln Gly Lys Tyr Asp Gly Pro Glu  
115 120 125  
gtg gac atc tgg acg ctg ggt atc ctg tac acg ctg gtc agc ggc 672  
Val Asp Ile Trp Ser Leu Gly Val Ile Leu Tyr Thr Leu Val Ser Gly  
130 135 140  
tcc ctg ccc ttc gat ggg cac aac ctc aag gag ctg cgg gag cga gtc 720  
Ser Leu Pro Phe Asp Gly His Asn Leu Lys Glu Leu Arg Glu Arg Val  
145 150 155  
ctc aga gga aag tac cgg gtc ccc ttc tac atg tct aca gac tgc gag 768  
Leu Arg Gly Lys Tyr Arg Val Pro Phe Tyr Met Ser Thr Asp Cys Glu  
160 165 170 175  
agc att ctg cgg aga ttt ctg gtg ctg aac ccc gca aaa cgc tgt act 816  
Ser Ile Leu Arg Arg Phe Leu Val Leu Asn Pro Ala Lys Arg Cys Thr  
180 185 190  
ctg gag caa atc atg aaa gac aaa tgg atc aac atc ggc tat gag ggt 864  
Leu Glu Gln Ile Met Lys Asp Lys Trp Ile Asn Ile Gly Tyr Glu Gly  
195 200 205  
gag gag ctg aag cca gac acg gag ctc aaa gaa gag cgg atg ccg ggt 912

WO 03/037257

PCT/US02/34574

Glu Glu Leu Lys Pro Asp Thr Glu Leu Lys Glu Glu Arg Met Pro Gly  
 210 215 220

cgg aaa ggc agc tgc agt gca gtg ggc agt gga agt cga ggc ttg ccc 960  
 Arg Lys Ala Ser Cys Ser Ala Val Gly Ser Gly Ser Arg Gly Leu Pro  
 225 230 235

ccc tcc agc ccc atg gtc agc agt gcc cac aac ccc aat aag gca gag 1008  
 Pro Ser Ser Pro Met Val Ser Ser Ala His Asn Pro Asn Lys Ala Glu  
 240 245 250 255

atc cct gag cgg cgg aag gac agc act agc acc cct aac aac ctc ccc 1056  
 Ile Pro Glu Arg Arg Lys Asp Ser Thr Pro Asn Asn Leu Pro  
 260 265 270

ccc agc atg atg acc cga aga aac acc tat gtg tgc aca gag cga cca 1104  
 Pro Ser Met Met Thr Arg Arg Asn Thr Tyr Val Cys Thr Glu Arg Pro  
 275 280 285

gga tct gaa cgc cgg tcc ttg ttg ccc aat ggc aaa gaa aat agc tcc 1152  
 Gly Ser Glu Arg Pro Ser Leu Leu Pro Asn Gly Lys Glu Asn Ser Ser  
 290 295 300

ggc acc tcg cgg gtg ccc cct gcc tcg bct tcc agt cat agc ctg gct 1200  
 Gly Thr Ser Arg Val Pro Pro Ala Ser Pro Ser His Ser Leu Ala  
 305 310 315

ccc ccg tca ggc gag cgg agc cgc ctg gct cgg ggc tcc acc atc cgc 1248  
 Pro Pro Ser Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala Arg Gly Ser Thr Ile Arg  
 320 325 330 335

agg acc ttc cat cgg ggc cag gtc cga gac cgg cgg gca ggg agg ggg 1296  
 Ser Thr Phe His Gly Gly Gln Val Arg Asp Arg Arg Ala Gly Ser Gly  
 340 345 350

agt ggc ggg ggt gtg cag aat gga ccc cca gca tcc acc acg ctt gcc 1344  
 Ser Gly Gly Val Gln Asn Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ala  
 355 360 365

cac gag gcc gca ccc ctg ccc tcc egg egg cct ccc acc acc acc aac 1392  
 His Glu Ala Ala Pro Leu Pro Ser Gly Arg Pro Arg Pro Thr Thr Asn  
 370 375 380

ctc ttc acc aag ctg acc tcc aaa ctg acc cga agg gtc aca gac gaa 1440  
 Leu Phe Thr Lys Leu Thr Ser Lys Leu Thr Arg Arg Val Thr Asp Glu  
 385 390 395

cct gag aga atc ggg gga cct gag gtc aca agt tgc cat cta cct tgg 1488  
 Pro Glu Arg Ile Gly Gly Pro Glu Val Thr Ser Cys His Leu Pro Trp  
 400 405 410 415

gat aaa acg gaa acc'gcc ccc agg ctg ctc cga ttc ccc tgg agt gtg 1536  
 Asp Lys Thr Glu Thr Ala Pro Arg Leu Leu Arg Phe Pro Trp Ser Val  
 420 425 430

aag ctg acc agc tgg cga cct tcc tga ggccctgatg gtcggccctgc 1583  
 Lys Leu Thr Ser Arg Pro Ser \*  
 435

gacaggccac a 1594

## 【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  
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/037257 A3

(51) International Patent Classification? C07H 21/02, 21/02, A61K 48/00, 39/395, C12N 15/85, 15/86, C12Q 01/68

(21) International Application Number: PCT/US2002/034574

(22) International Filing Date: 29 October 2002 (29.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/335,006 31 October 2001 (31.10.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): WILLIAMSON, Mark [US/US]; 15 Stonecrest Drive, Saugus, MA 01906 (US).

(74) Agents: SIOUSSAT, Tracy, M. et al.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., Legal-Intellectual Property (OBW-16), 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Published:  
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 22 January 2004

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 2003/037257 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS USING 20750

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, e.g., cancer, including, but not limited to colon, breast, and lung cancer. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a cellular proliferation disorder. The invention also provides methods for identifying a compound capable of modulating a cellular proliferation disorder. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 20750 polypeptide activity or aberrant 20750 nucleic acid expression.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/34574
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : C07H 21/02, 21/02, A61K 48/00, 39/395; C12N 15/85, 15/86; C12Q 01/68 US CL. : 435/6, 7.1, 325, 375; 536/23.1, 24.5; 514/1, 2, 44; 424/130.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1, 325, 375; 536/23.1, 24.5; 514/1, 2, 44; 424/130.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, medline, capus, lifesci, embase, uspaful, biosis		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0108937 A1 (WILLIAMSON, M) 12 June 2003 (12.06.03), see entire document	1-13
A	US 2002/0151020 A1 (YAN ET AL.) 17 October 2002 (17.10.02), see entire document, especially SEQ ID NO:2.	1-13
X	WO 00/73469 A2 (SUGEN, INC.) 07 December 2000 (07.12.2000), see entire document, especially SEQ ID NO:34.	1-13
A	KATO ET AL, Isolation of a Novel Human Gene, MARKL1, Homologous to MARK3 and Its Involvement in Hepatocellular Carcinogenesis. Neoplasia. March 2001, Vol. 3, No. 1, pages 4-9, see entire document.	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other events</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
Date of the actual completion of the international search 08 September 2003 (08.09.2003)	Date of mailing of the international search report <b>03 OCT 2003</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	<p>Authorized officer <i>Valerie Bell-Harris Jr.</i> Karen A. Lacouriere</p> <p>Telephone No. (703) 308-0196</p>	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
C 1 2 Q 1/48 C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注:以下のものは登録商標)

ポケットベル

(72) 発明者 ウィリアムソン, マーク  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01906, サウガス, ストーンクレスト ドライブ  
15

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 HA11  
HA12  
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ26 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS02  
QS25 QS34 QX02  
4C084 AA16 NA14 ZB261