

(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2005-508160

(P2005-508160A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 201 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-529971 (P2003-529971)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年9月17日 (2002. 9. 17)		ミレニアム・ファーマシューティカルズ・
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月17日 (2004. 3. 17)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029353		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/025199		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年3月27日 (2003. 3. 27)		アメリカ合衆国02139マサチューセッ
(31) 優先権主張番号	60/323, 018		ツ州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年9月18日 (2001. 9. 18)		ート40番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ヒトチロシンホスファターゼファミリーメンバーであるM I D 4 4 6 Oおよびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、新規のチロシンホスファターゼファミリーメンバーをコードする単離された核酸分子 (M I D 4 4 6 O 核酸分子と示す) を提供する。本発明はまた、アンチセンス核酸分子、M I D 4 4 6 O 核酸分子を含む組換え発現ベクター、その発現ベクターが導入される宿主細胞、およびM I D 4 4 6 O 遺伝子が導入または破壊された非ヒトトランスジェニック動物を提供する。本発明は、なお、単離されたM I D 4 4 6 O タンパク質、M I D 4 4 6 O 融合タンパク質、M I D 4 4 6 O 抗原性タンパク質、および抗M I D 4 4 6 O 抗体をさらに提供する。本発明の組成物を利用する診断方法および治療方法もまた、提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

病理学的障害に関連する核酸分子を同定する方法であって、該方法は、以下：

a) 核酸分子を含むサンプルを、配列番号 1 または 3 の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含むハイブリダイゼーションプローブと接触させる工程；および該プローブにハイブリダイズする該サンプル中の核酸分子の存在を検出する工程、ならびに

b) 核酸分子を含むサンプルを、第一の増幅プライマーおよび第二の増幅プライマーと接触させる工程であって、該第一のプライマーは、配列番号 1 または 3 の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含み、そして該第二のプライマーは、配列番号 1 または 3 の相補体由来の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含む、工程；核酸増幅を可能にする条件下で該サンプルをインキュベートする工程；ならびに該サンプル中の増幅された核酸分子の存在を検出する工程、

からなる群より選択され、それによって、病理学的障害に関連する核酸分子を同定する、方法。

10

## 【請求項 2】

病理学的障害に関連するポリペプチドを同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) ポリペプチドを含むサンプルを、4460 結合物質と接触させる工程；および

b) 該 4460 結合物質に結合する、該サンプル中のポリペプチドの存在を検出する工程を包含し、

それによって病理学的障害に関連するポリペプチドを同定する、方法。

20

## 【請求項 3】

病理学的障害を有するか、または病理学的障害を発症する危険性のある被験体を同定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該被験体から得られた、核酸分子を含むサンプルを、配列番号 1 または 3 の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含むハイブリダイゼーションプローブと接触させる工程；および該プローブにハイブリダイズする、該サンプル中の核酸分子の存在を検出する工程；ならびに

b) 該被験体から得られた、核酸分子を含むサンプルを、第一の増幅プライマーおよび第二の増幅プライマーと接触させる工程であって、該第一のプライマーは、配列番号 1 または 3 の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含み、そして該第二のプライマーは、配列番号 1 または 3 の相補体由来の少なくとも 25 連続するヌクレオチドを含む、工程；核酸増幅を可能にする条件下で該サンプルをインキュベートする工程；ならびに該サンプル中の増幅された核酸分子の存在を検出する工程、

からなる群より選択され、それによって、病理学的障害を有するか、または病理学的障害を発症する危険性のある被験体を同定する、方法。

30

## 【請求項 4】

病理学的障害を有するか、または病理学的障害を発症する危険性のある被験体を同定する方法であって、該方法は、以下：

a) 該被験体から得たポリペプチドを含むサンプルを、4460 結合物質と接触させる工程；および

b) 該 4460 結合物質に結合する、該サンプル中のポリペプチドの存在を検出する工程を包含し、

それによって、病理学的障害を有するか、または病理学的障害を発症する危険性のある被験体を同定する、方法。

40

## 【請求項 5】

異常な 4460 ポリペプチド活性または異常な 4460 核酸発現によって特徴付けられる病理学的障害を有する被験体、または該病理学的障害を処置するための方法であって、該方法は、該被験体に 4460 調節因子を投与する工程を包含し、それによって、病理学的障害を有する該被験体を処置する、方法。

50

## 【請求項 6】

前記調節因子が、有機低分子、ペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体からなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記病理学的障害が、心血管障害である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 8】

4460 ポリペプチドに結合する薬剤を検出する方法であって、該方法は、以下の工程：  
a) 有機低分子、ペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体からなる群より選択される薬剤を合わせる工程；ならびに

b) 該 4460 ポリペプチドに対する薬剤の結合に適切な条件下で、該薬剤と該 4460 ポリペプチドとの間の複合体の形成を検出または測定する工程、  
を包含し、それによって、該 4460 ポリペプチドに結合する薬剤を同定する、方法。

## 【請求項 9】

前記薬剤が、4460 ポリペプチド活性の調節因子である、請求項 7 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(関連出願)

本願は、2001 年 9 月 18 日に出願された米国仮出願第 60 / 323, 018 号（この内容は本明細書中で参考として援用される）の優先権を主張する。

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

タンパク質と密に会合したホスフェートは、19 世紀後半から知られている。その後、タンパク質へのホスフェートの種々の共有結合が見出されてきた。最も一般的なものは、セリンおよびスレオニンへのホスフェートのエステル化を含み、ここで少量は、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびシステインに共有結合している。リン酸化されたタンパク質の出現は、タンパク質上のアミノ酸残基をリン酸化し得る 1 つ以上のタンパク質キナーゼの存在、およびまたタンパク質上のリン酸化されたアミノ酸残基を加水分解し得るタンパク質ホスファターゼの存在を示す。

## 【0003】

タンパク質キナーゼは、細胞増殖および細胞分化と関連した生物学的変化および形態学的変化の調節において重要な役割を果たす (D'Ursio, G. ら (1990) Science 250: 786 - 791; Birchmeier, C. ら (1993) Bioessays 15: 185 - 189)。これらは、増殖因子レセプターおよびシグナルトランスデューサーとして働き、かつ細胞形質転換および悪性疾患に関連している (Hunter, T. ら (1992) Cell 70: 375 - 387; Posada, J. ら、(1992) Mol. Biol. Cell 3: 583 - 592; Hunter, T. ら (1994) Cell 79: 573 - 582)。例えば、タンパク質キナーゼは、増殖因子レセプターからのシグナルの伝達 (Sturgill, T. W. ら (1988) Nature 344: 715 - 718; Gomez, N. ら (1991) Nature 353: 170 - 173)、細胞の有糸分裂の開始の制御 (Nurse, P. (1990) Nature 344: 503 - 508; Maller, J. L. (1991) Curr. Opin. Cell Biol. 3: 269 - 275) およびアクチン構築の調節 (Husain-Chishti, A. ら (1988) Nature 334: 718 - 721) に関与することが示されている。

## 【0004】

細胞におけるタンパク質のチロシンのリン酸化の全レベルおよび任意の所定のタンパク質のリン酸化状態は、タンパク質チロシンキナーゼ (PTK) およびタンパク質チロシンホスファターゼ (PTPase) の活性のバランスから生じる。従って、PTPase は、

10

20

30

40

50

細胞増殖制御の重要な調節エレメントとして提案されている (Hunter, 1989, Cell 58: 1013 - 1016)。

#### 【0005】

PTPaseよりも10年以上早くPTKが発見され、そして特徴付けられており、そしてここ数年で、多数の研究が、多くの新たなPTPaseの同定に至っており、そしてこれらのいくつかは、正確に特徴付けられている。さらに、細胞におけるいくつかのPTPaseの生物学的役割についての知見が、最近報告されている (Pondaven, 1991, Adv Prot Phosphatases 6: 35 - 57)。現在の研究は、PTKおよびPTPaseが、細胞増殖制御から細胞の分化および発生にわたる多くの生物学的プロセスにおいて同様に重要であることを示唆する。特に、PTKの癌遺伝子潜在性およびPTPaseが抗増殖性アクチンによりPTK癌遺伝子活性化を妨げる能力は、多くの場合、PTPaseをコードする遺伝子が、腫瘍抑制遺伝子、またはさらには抗癌遺伝子とみなされ得ることを示唆する。

10

#### 【0006】

PTPaseの存在は、初め、インビトロのリン酸化された膜タンパク質のリン酸化の迅速な現象を説明すると予想された (Carpenterら, 1979, J. Biol. Chem. 254: 4884 - 4891)。ヒト胎盤における主要なPTPase (PTP1B) は、均質になるまで精製され、そして配列決定された (Tonksら, 1988, J. Biol. Chem. 263: 6722 - 2730; Charbonneauら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5252 - 5256)。

20

PTP1Bの触媒ドメインとリンパ球共通抗原 (LCAまたはCD45) との間の配列相同性は、証明されており、このことは、PTPaseが構造的に関連した分子のファミリーとみなされ得ることを示している。

#### 【0007】

多くの増殖因子 (例えば、NGF、BDNF、NT3、FGF、インシュリンおよびIGF1) の効果は、チロシンキナーゼ活性に対する高親和性レセプターにより媒介されることが知られている (Fantlら, Annu. Rev. Biochem., 62 (1993) 453 - 481; SchlessingerおよびUlrich Neuron, 9 (1992) 383 - 391; UlrichおよびSchlessinger Cell, 61 (1990) 203 - 212)。いくつかのチロシンホスファターゼ遺伝子の発現は、脳において検出され (Jonesら, J. Biol. Chem., 264 (1989) 7747 - 7753)、これにはRPTP (Kaplanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990) 7000 - 7004; Sapら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990) 6112 - 6116)、RNPTPX (Guanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1991) 1501 - 1505)、STEP (Lombrosoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 (1991) 7242 - 7246)、SH-PTP2 (Freemanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 11239 - 11243)、MPTP (Mizunoら, Mol. Cell. Biol., 13 (1993) 5513 - 5523)、DPTP99AおよびDPTP10D (Yangら, Cell, 67 (1991) 661 - 673) が挙げられる。

30

40

#### 【0008】

NGF、BDNF、インシュリンまたはIGF1のいずれかの脳室内投与は、海馬のCA1部分領域における遅発性神経細胞死を防止する (Beckら, J. Cereb Blood Flow Metab., 14 (1994) 689 - 692; Shigenoら, J. Neurosci., 11 (1991) 2914 - 2919; ZhuおよびAuer J. Cereb. Blood Flow Metab., 14 (1994) 237 - 242)。

#### 【0009】

チロシンキナーゼインヒビターは、MAPキナーゼのチロシンリン酸化をブロックし (B

50

lenis Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 (1993) 5889 - 5892; Pelech and Sanghera Science, 257 (1992) 1335 - 1356)、そして前脳虚血後の遅発性ニューロン死 (delayed neuronal death) を防ぐ (Kindy J. Cereb. Blood Flow Metab, 13 (1993) 372 - 377)。虚血後の再灌流の間、タンパク質のチロシンリン酸化は、海馬中で増加するが、海馬中のいくつかのタンパク質は、脱リン酸化される (Campos - Gonzalez J. Neurochem, 59 (1992) 1955 - 1958; HuおよびWieloch J. Neurochem, 62 (1994) 1357 - 1367; Takanoら, J. Cereb. Blood Flow Metab., 15 (1995) 33 - 41)。これらの観察は、チロシンリン酸化が、虚血 - 再灌流障害の結果として起こる遅発性ニューロン死において重要な役割を果たすことを示唆する。 10

#### 【0010】

多くのPTPaseは、ホスホチロシンに対する加水分解性活性に加えて、ある程度のホスホセリン/ホスホスレオニンホスファターゼ活性を示す。これらの酵素は、ほとんどが核内に局在化され、2重特異的 (dual-specificity) PTPase (dsPTPase) と呼ばれ、ERKのようなシグナル変換タンパク質の活性を制御することによって、おそらく細胞周期制御およびマイトジェンのシグナル伝達の重要な制御因子として作用するPTPaseのサブクラスとして出現している。実際、これらの酵素は、インビボの核脱リン酸化ならびに核リン酸化の不活性化およびMAPキナーゼの不活性化を引き起こすようである (Alessiら, 1995, Curr Biol 5: 195 - 283)。これらの酵素は、ワクシニアH-1遺伝子産物 (最初に同定されたdsPTPaseである) と同一の配列を示す (Guanら, 1991, Nature 350: 359 - 362)。長さが互いに異なるいくつかのdsPTPaseが、同定されている。これらの酵素および他のPTPaseサブクラスは、この領域を越える制限された配列相同性のみを示す活性部位配列モチーフを共有する。 20

#### 【0011】

細胞周期の調節において、このようなタンパク質チロシンホスファターゼの重要性を考えた場合、増殖抑制因子のような細胞周期の調節因子として機能する新規のタンパク質チロシンホスファターゼを同定する必要がある存在し、これらの異常な機能は、癌のような不適切な細胞周期調節から生じる障害をもたらし得る。 30

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

#### (発明の要旨)

本発明は、本明細書中で「MID4460」と呼ばれる新規のチロシンホスファターゼファミリーメンバーの発見に一部基づく。MID4460をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、配列番号1に示され、そしてMID4460ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2に示される。さらに、コード領域のヌクレオチド配列は、配列番号3に示される。 40

#### 【0013】

従って、1つの局面において、本発明は、MID4460タンパク質またはMID4460ポリペプチドをコードする核酸分子 (例えば、MID4460タンパク質の生物学的に活性な部分) を特徴とする。好ましい実施形態において、単離された核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする。他の実施形態において、本発明は、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列を有する、単離されたMID4460核酸分子を提供する。なお他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に示されるヌクレオチド配列と実質的に同一である (例えば、天然に存在する対立遺伝子改変体) 核酸分子を提供する。他の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1または 50

配列番号3のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする核酸分子を提供し、この核酸は、全長M I D 4 6 0タンパク質またはその活性フラグメントをコードする。

【0014】

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M I D 4 4 6 0核酸分子を含む、核酸構築物をさらに提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、ネイティブの調節配列または異種調節配列に作動可能に連結される。本発明のM I D 4 4 6 0核酸分子を含むベクターおよび宿主細胞（例えば、ポリペプチドを産生するのに適切なベクターおよび宿主細胞）もまた、含まれる。

【0015】

別の関連する局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0コード核酸の検出用のプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして適切な核酸フラグメントを提供する。 10

【0016】

なおさらに別の関連する局面において、核酸分子をコードするM I D 4 4 6 0に対するアンチセンスである、単離された核酸分子が提供される。

【0017】

別の局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0ポリペプチドおよびその生物学的に活性なフラグメントまたは抗原性フラグメントを提供する。これらは、例えば、チロシンホスファターゼ関連障害または他のM I D 4 4 6 0関連障害の処置および診断に適用可能であるアッセイ中の試薬または標的として有用である。別の実施形態において、本発明はM I D 4 4 6 0活性を有するM I D 4 4 6 0ポリペプチドを提供する。好ましいポリペプチドは、少なくとも1つのチロシンホスファターゼドメインを含むM I D 4 4 6 0タンパク質であり、そして好ましくは、M I D 4 4 6 0活性（例えば、本明細書中に記載されるようなM I D 4 4 6 0活性）を有する、M I D 4 4 6 0タンパク質である。 20

【0018】

他の実施形態において、本発明は、M I D 4 4 6 0ポリペプチド（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するM I D 4 4 6 0ポリペプチド）；配列番号2に示されるアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列；または、本明細書中に記載されるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号1もしくは配列番号3のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を提供し、ここで、この核酸は、全長M I D 4 4 6 0タンパク質またはその活性フラグメントをコードする。 30

【0019】

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M I D 4 4 6 0核酸分子を含む核酸構築物をさらに提供する。

【0020】

関連する局面において、本発明は、融合タンパク質を形成するように非M I D 4 4 6 0ポリペプチドに作動可能に連結されたM I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0フラグメントを提供する。

【0021】

別の局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0ポリペプチドと反応するか、あるいはより好ましくはこれに特異的または選択的に結合する抗体およびそれらの抗原結合フラグメントを特徴とする。 40

【0022】

別の局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0核酸の発現または活性を調節する化合物をスクリーニングするための方法を提供する。

【0023】

なお別の局面において、本発明は、例えば、本明細書中で記載されるスクリーニングにおいて同定される化合物を用いる、M I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0核酸の発現または活性を調節するためのプロセスを提供する。特定の実施形態において、本発明の方法は、M I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0核酸の異常な活性または 50

発現に関連する状態（例えば、異常なチロシンホスファターゼの機能もしくは発現、またはチロシンホスファターゼの機能もしくは発現の欠損に関連する状態または障害）の処置に関連する。そのような障害の例としては、心臓血管障害（高コレステロール血症およびアテローム性動脈硬化症が挙げられるが、これらに限定されない）および肝臓障害が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

本発明はまた、疾患の診断に関連する、生物学的サンプル中のM I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0核酸分子の活性またはその存在もしくは非存在を決定するためのアッセイを提供する。

【0025】

さらなる局面において、本発明は、疾患の診断に関連する、M I D 4 4 6 0ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0核酸分子の遺伝的变化の存在または非存在を決定するためのアッセイを提供する。

【0026】

別の局面において、本発明は、複数のアドレスを有する二次元のアレイであって、複数のアドレスの各々が、他の複数の各々と位置的に認識可能であり、そして複数のアドレスの各々が、独特の捕捉プローブ（例えば、核酸配列またはペプチド配列）を有するアレイを特徴とする。複数のアドレスのうち少なくとも1つは、M I D 4 4 6 0分子を認識する捕捉プローブを有する。1つの実施形態において、この捕捉プローブは、核酸（例えば、M I D 4 4 6 0核酸配列に相補的なプローブ）である。別の実施形態において、捕捉プローブは、ポリペプチド（例えば、M I D 4 4 6 0ポリペプチドに特異的な抗体）である。また、前述のアレイに、サンプルを接触させ、そしてこのアレイへのこのサンプルの結合を検出させることによりこのサンプルを分析する方法を、特徴とする。

【0027】

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添付の特許請求の範囲から明らかである。

【0028】

（発明の詳細な説明）

ヒトM I D 4 4 6 0配列（図1a；配列番号1）（非翻訳領域を含み、約3900ヌクレオチド長である）は、約3357ヌクレオチドの、予測されたメチオニンで開始されて終止コドンを含むコード配列を含む（図1a～図1cにおける配列番号1のコードとして示されるヌクレオチド；配列番号3）。このコード配列は、1118アミノ酸のタンパク質（配列番号2）を含んでいる。配列番号2および図2のヒトM I D 4 4 6 0タンパク質は、約25アミノ酸であり、シグナル配列と一致する、アミノ末端の疎水性アミノ酸配列を含み（配列番号2のアミノ酸1～アミノ酸約25、P S O R T, N a k a iおよびK a n e h i s a（1992）Genomics 14:897-911）、これは、切断されて、成熟タンパク質形態の産生をもたらす。この成熟タンパク質形態は、（配列番号2のアミノ酸の約26～アミノ酸の約1118の）約1093アミノ酸残基長である。

【0029】

ヒトM I D 4 4 6 0は、以下の領域または他の構造的特徴を含む（ここで、P F A Mの識別子、P Sプレフィクス（P S p r e f i x）およびP Fプレフィクスドメイン識別番号（P F p r e f i x d o m a i n i d e n t i f i c a t i o n n u m b e r）についての一般情報は、S o n n h a m m e rら（1997）Protein 28:405-420および<http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>を参照のこと）；配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるフィブロネクチンIII型ドメイン（P F A Mアクセション番号P F 0 0 0 4 1）：28～108、119～201、299～381、388～469、477～559、567～656；配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるタンパク質-チロシンホスファターゼドメイン（P F A Mアクセション番号P F 0 0 1 0 2）：846～1080；

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるホスファターゼヒドロラーゼ糖タンパク質リビート膜貫通シグナル前駆体タンパク質ドメイン (ProDom番号PD016388): 20~756;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるホスファターゼヒドロラーゼタンパク質-チロシンPTPaseドメイン (ProDom番号PD061758): 31~1027;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるホスファターゼチロシンSAP-1レセプター型PTP前駆体癌関連ヒドロラーゼタンパク質-チロシンドメイン (ProDom番号PD127840): 779~814;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるホスファターゼ型ヒドロラーゼ非レセプターPTPaseチロシンホスホチロシンドメイン (ProDom番号PD097276): 783~865;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるホスファターゼヒドロラーゼチロシンリビートオステオテストイキュラ (osteotesticular) 前駆細胞シグナル糖タンパク質膜貫通ドメイン (ProDom番号PD038230): 797~954;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるヒドロラーゼホスファターゼレセプターチロシンタンパク質-チロシン前駆体シグナル免疫グロブリンドメイン膜貫通ドメイン (ProDom番号PD333871): 917~1027;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるヒドロラーゼR09E10.2類似T22C1.8 F54F12.1 F36H1.3タンパク質-チロシンホスファターゼH06I04.5ドメイン (ProDom番号PD028836): 971~1978;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸残基に位置付けられるHホスファターゼチロシン膜貫通ドメイン (ProDom番号PD312226): 27~756;

配列番号2のおよそアミノ酸8~25および754~778、または成熟タンパク質 (配列番号4) のおおよそアミノ酸59~76および729~753に位置する2個の膜貫通ドメイン (MEMSAT ((Jonesら (1994) Biochemistry 33: 3038-3049) によって予測した)

配列番号2のおよそアミノ酸1020~1032に位置するチロシン特異的タンパク質ホスファターゼ活性部位 (VHC SAGVGRTGTL);

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸に位置する5個のジロイシンモチーフ (dilucine motif) (PSORT, <http://psort.nibb.ac.jp>): 965~966、966~967、967~968、998~999、および1038~1039;

配列番号2のおよそ以下のアミノ酸に位置する9個のタンパク質キナーゼCリン酸化部位 (Prositite PS00005): 197~199 (SSR)、289~291 (SWR)、377~379 (SSR)、533~535 (TLK)、624~626 (TSR)、961~963 (TVR)、977~979 (SVR)、1103~1105 (STR)、および1114~1116 (SWR);

17のカゼインキナーゼIIリン酸化部位 (Prositite PS00006) は、配列番号2のアミノ酸約197~200 (SSRE)、約237~240 (TELD)、約245~248 (SALE)、約263~266 (SPVD)、約377~380 (SSRE)、約484~487 (SKQD)、約528~531 (SGTD)、約533~536 (TLKE)、約665~668 (TYPD)、約713~716 (SCGE)、約735~738 (TIWD)、約798~801 (SPGD)、約842~845 (SASE)、約887~890 (SPQE)、約901~904 (TVGD)、約961~964 (TVRE)、および約993~996 (SSPD) に位置していた;

1つのcAMP/cGMP依存性タンパク質キナーゼリン酸化部位 (Prositite PS00004) は、配列番号2のアミノ酸約1091~1094 (RRKS) に位置して

10

20

30

40

50



いた；

1つのチロシンキナーゼリン酸化 (Prosite PS00007) は、アミノ酸約 626 ~ 632 (RTNETWY) に位置していた；

27のN-グリコシル化部位 (Prosite PS00001) は、配列番号2のアミノ酸約35 ~ 38 (NLT V)、約78 ~ 81 (NTTA)、約83 ~ 86 (NVT V)、約107 ~ 110 (NSSV)、約132 ~ 135 (NSSI)、約149 ~ 152 (NSTY)、約172 ~ 175 (NITV)、約196 ~ 199 (NSSR)、約203 ~ 206 (NATT)、約286 ~ 289 (NSSS)、約304 ~ 307 (NLT V)、約312 ~ 315 (NSSI)、約329 ~ 332 (NSTY)、約352 ~ 355 (NITV)、約376 ~ 379 (NSSR)、約383 ~ 386 (NATT)、約401 ~ 404 (NSSI)、約436 ~ 439 (NTTN)、約470 ~ 473 (NVSI)、約490 ~ 493 (NSTI)、約558 ~ 561 (NSTL)、約575 ~ 578 (NETQ)、約622 ~ 625 (NQTS)、約628 ~ 631 (NETW)、約644 ~ 647 (NFTV)、約878 ~ 881 (NASF)、および約959 ~ 962 (NWT V) に位置していた；そして

26のN-ミリスチル化部位 (Prosite PS00008) は、配列番号2のアミノ酸約3 ~ 8 (GAGGGL)、約9 ~ 14 (GVWGNL)、約72 ~ 77 (GTTETR)、約88 ~ 93 (GLGP GS)、約105 ~ 110 (GVNSSV)、約111 ~ 116 (GTVTTA)、約153 ~ 158 (GVEYTG)、約160 ~ 165 (GGRAGT)、約177 ~ 182 (GLEPGC)、約194 ~ 199 (GINS SR)、約267 ~ 272 (GLGP GS)、約284 ~ 289 (GVNSSS)、約333 ~ 338 (GVEYTG)、約340 ~ 345 (GGRAGT)、約374 ~ 379 (GINS SR)、約430 ~ 435 (GGTETR)、約450 ~ 455 (GTL YTF)、約463 ~ 468 (GARG SR)、約529 ~ 534 (GTDITL)、約640 ~ 645 (GTL YNF)、約693 ~ 698 (GGYEAF)、約703 ~ 708 (GGQRGS)、約722 ~ 727 (GLGP AR)、約755 ~ 760 (GVIA GA)、約1025 ~ 1030 (GVGR TG)、および約1080 ~ 1085 (GSSNSQ) に位置していた。

#### 【0030】

MID4460タンパク質は、チロシンホスファターゼファミリーおよびフィブロネクチンファミリーのメンバーに共通する有意な数の構造的特徴を含む。用語「ファミリー」は、本発明のタンパク質分子および核酸分子を言及する場合、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、そして本明細書中に規定される十分なアミノ酸配列相同性およびヌクレオチド配列相同性を有する、2つ以上のタンパク質分子または核酸分子を意味する。このようなファミリーメンバーは、天然に存在し得るかまたは天然に存在しないものであり得、そして同じ種かまたは異なる種由来のいずれかであり得る。例えば、あるファミリーは、ヒト起源の第1のタンパク質およびヒト起源の他の異なるタンパク質を含み得、あるいは、非ヒト起源 (例えば、ラット起源またはマウス起源) のホモログを含み得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特徴を有し得る。

#### 【0031】

本明細書中で使用される場合、用語「チロシンホスファターゼ」または「PTPase」は、リン酸化されたチロシン残基、セリン残基またはスレオニン残基 (好ましくは、このリン酸化アミノ酸残基は、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の一部である) のリン酸エステル結合の加水分解を触媒し得るタンパク質またはポリペプチドを含む。

#### 【0032】

チロシンホスファターゼファミリーメンバーのタンパク質は、短い膜貫通セグメントにより細胞内 (触媒) ドメインに結合されたレセプター様細胞外領域により特徴付けられる (Streuli および Saito, 1993, Adv. Prot. Phosphatases 7: 67-94)。非膜貫通 (細胞質) PTPase は、代表的に少なくとも1つの触媒ドメインを含む (Kochら、1991, Science 252: 1013-1

10

20

30

40

50

016)。タンパク質チロシンホスファターゼ前駆体 (EC 3.1.3.48) (レセプターH型前駆体) とのMID 4460タンパク質のアラインメントは、図5に示され、そして2つの配列間の約100%の配列同一性を実証する (blossum62.iijmatrixからのmatblasにおいて計算した場合)。

#### 【0033】

MID 4460ポリペプチドは、「タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン」または「タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン」と相同な領域を含み得る。MID 4460ポリペプチドは、「フィブロネクチンIII型ドメイン」または「フィブロネクチンIII型ドメイン」と相同な領域、および少なくとも1つの触媒領域を含み得るか、またはさらに含み得る。

10

#### 【0034】

本明細書中で使用される場合、用語「タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン」は、約200~400アミノ酸残基長であり、かつタンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (HMM) に対する配列のアラインメントについて少なくとも300のビットスコアを有するアミノ酸配列を含む。好ましくは、タンパク質 - チロシンホスファターゼドメインは、リン酸エステル結合の加水分解の触媒作用を媒介する。好ましくは、タンパク質 - チロシンホスファターゼドメインは、少なくとも約100~500のアミノ酸残基、より好ましくは約200~300のアミノ酸残基、または約250~300のアミノ酸を含み、そしてタンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (HMM) に対する配列のアラインメントについて少なくとも300、350、375またはより多くのビットスコアを有する。タンパク質 - チロシンホスファターゼドメインは、リン酸エステル結合の加水分解を触媒し得る。タンパク質 - チロシンホスファターゼドメインは、Prositeチロシン特異的タンパク質ホスファターゼ活性部位シグネチャー (signature) 配列PS00383 ([LIVMF] - H - C - x (2) - G - x (3) - [STC] - [STAGP] - x - [LIVMFY])、またはそれに相同な配列を含み得る。上記の保存されたシグネチャー配列、および本明細書中に記載される他のモチーフまたはシグネチャー配列において、アミノ酸の標準IUPAC一文字コードを使用する。パターン内の各エレメントは、ダッシュ ( - ) により隔てられる；角括弧 ( [ ] ) は、その位置に受け入れられる特定の残基を示す；xは、任意の残基がその位置に受け入れられることを示す；そして括弧 ( ( ) ) 内の数字は、付随するアミノ酸により表される残基の数を示す。このタンパク質チロシンホスファターゼドメインは、ヒトMID 4460ポリペプチドのC末端細胞質ドメインに位置し、そしてこれは、配列番号2のアミノ酸約1020~1032に対応する。タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (HMM) は、PFAM受入番号PF00102を割り当てられた (<http://genome.wustl.edu/Pfam/.html>)。さらに、タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (HMM) は、SMART識別子ptp\_7またはPTPc\_3 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) を割り当てられた。本明細書中で使用される場合、「タンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン」は、以下のProDomファミリー「Hホスファターゼチロシン膜貫通型」ドメイン (ProDomain Release 2001.1; <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>、図4) のいずれかまたは両方に対して相同である (例えば、少なくとも約84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である)、ヒトMID 4460タンパク質の一部である。ヒトMID 4460のタンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (配列番号2のアミノ酸1~217) の、PD312226 (配列番号X) とのBLAST検索モデルから誘導されたアラインメントは、(blossum62matrixからのProDomainで計算された場合、図4) 100%の同一性を示す。ヒトMID 4460のタンパク質 - チロシンホスファターゼドメイン (配列番号2のアミノ酸846~1080) の、Pfamタンパク質 - チロシンコンセンサスアミノ酸配列 (配列番号X) との、隠れた (hidden) Markovモデルに由

20

30

40

50

来するアラインメントを図 3 に示す。

【 0 0 3 5 】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0 ポリペプチドまたはタンパク質は、「タンパク質チロシンホスファターゼドメイン」、または少なくとも約 2 0 0 ~ 3 0 0 のアミノ酸残基、より好ましくは約 2 5 0 ~ 3 0 0 のアミノ酸残基、もしくは 2 7 5 ~ 3 0 0 のアミノ酸残基を含み、かつ「タンパク質チロシンホスファターゼドメインドメイン」（例えば、ヒト M I D 4 4 6 0 のタンパク質チロシンホスファターゼドメイン（例えば、配列番号 2 の残基 8 4 6 ~ 1 0 8 0 ））と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % の相同性を有する領域を有する。

【 0 0 3 6 】

M I D 4 4 6 0 タンパク質配列における「タンパク質チロシンホスファターゼ」ドメインの存在を同定するため、そして目的のポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列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、デフォルトパラメーターを使用して H M M の P f a m データベース（例えば、P f a m database, release 2.1）（[http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM\\_search](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search)）に対して検索され得る。例えば、hmmsearch プログラム（検索プログラムの H M M E R パッケージの一部として入手可能）は、M I L P A T 0 0 6 3 についてのファミリー特異的デフォルトプログラムであり、そしてスコア 1 5 は、ヒットを決定するためのデフォルトの閾値スコアである。あるいは、ヒットを決定するための閾値スコアは、（例えば、8 ビットまで）下げられ得る。P f a m データベースの記載は、S o n h a m m e r ら（1997）Proteins 28:405-420に見出され得、そして H M M の詳細な説明は、例えば、G r i b s k o v ら（1990）Meth. Enzymol. 183:146-159; G r i b s k o v ら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355-4358; K r o g h ら（1994）J. Mol. Biol. 235:1501-1531; および S t u l t z ら（1993）Protein Sci. 2:305-314（これらの内容は、本明細書中に参考として援用される）に見出され得る。検索を H M M データベースに対して行い、配列番号 2 の残基約 8 4 6 ~ 1 0 8 0 においてヒト M I D 4 4 6 0 のアミノ酸配列における「タンパク質 - チロシンホスファターゼ」ドメインの同定をもたらした（図 1 を参照のこと）。

【 0 0 3 7 】

M I D 4 4 6 0 タンパク質配列における「タンパク質チロシンホスファターゼ」ドメインの存在を同定するため、そして目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを有することを決定するためのさらなる方法において、このタンパク質のアミノ酸配列は、S c h u l t z ら（1998）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857 および S c h u l t z ら（2000）Nucl. Acids Res 28:231に記載されるように、H M M の S M A R T データベース（Simple Modular Architecture Research Tool、<http://smart.embl-heidelberg.de/>）に対して検索され得る。このデータベースは、H M M e r 2 検索プログラムの隠れた M a r k o v モデルを用いたプロファイリングにより同定されたドメインを含む（D u r b i n ら（1998）Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press.; <http://hmm.wustl.edu/>）。このデータベースはまた、精度を増強するために専門家に広範囲にわたって注釈を付けられ、そしてモニタリングされる。H M M データベースに対して検索を実行し、配列番号 2 の残基約 8 2 1 ~ 1 0 8 3 におけるヒト M I D 4 4 6 0 のアミノ酸配列における「タンパク質チロシンキナーゼ」ドメインの同定をもたらした（図 1 を参照のこと）。

【 0 0 3 8 】

M I D 4460 タンパク質配列中のドメインのさらなる同定のため、および目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを有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を、ドメインのデータベース（例えば、ProDom データベース（Corpet ら（1999）, Nucleic Acids Res. 27: 263 - 267））に対して検索し得る。この ProDom タンパク質ドメインデータベースは、相同ドメインの自動的なコンパイルから構成される。ProDom の現在のバージョンは、SWISS-PROT 38 タンパク質データベースおよび TREMBL タンパク質データベースのリカーシブ PSI-BLAST 検索（Altschul ら（1997）Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402; Gouzy ら（1999）Computers and Chemistry 23: 333 - 340）を使用して構築される。このデータベースは、各ドメインについてコンセンサス配列を自動的に作成する。BLAST サーチを、HMM データベースに対して実行し、配列番号 2 の約残基 27 ~ 756 におけるヒト M I D 4460 のアミノ酸配列における「タンパク質チロシンホスファターゼ」ドメインの同定をもたらした（図 1 を参照のこと）。

10

#### 【0039】

M I D 4460 分子は、フィブロネクチン I I I 型ドメイン、好ましくは配列番号 2 の残基約 28 ~ 108、約 119 ~ 201、約 299 ~ 381、約 388 ~ 469、約 477 ~ 559、および約 567 ~ 656 において、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つのフィブロネクチン I I I 型ドメインをさらに含み得る。

#### 【0040】

20

M I D 4460 ポリペプチドは、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの「膜貫通ドメイン」または「膜貫通ドメイン」と相同な領域を含み得る。本明細書中で使用される場合、用語「膜貫通ドメイン」は、約 10 ~ 40 アミノ酸残基長のアミノ酸配列を含み、そして形質膜に及ぶ。膜貫通ドメインは、疎水性残基が豊富であり、例えば、膜貫通ドメインの少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % 以上のアミノ酸が、疎水性である（例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシン、またはトリプトファン）。膜貫通ドメインは、代表的に、 $\alpha$ -らせん構造を有し、そして例えば、Zagotta ら（1996）Annual Rev. Neurosci. 19: 235 - 263 に記載される（その内容は、本明細書中に参考として援用される）。ヒト M I D 4460 の膜貫通ドメインは、配列番号 2 の残基約 8 ~ 25 および約 754 ~ 778、または配列番号 4 の残基約 59 ~ 76 および約 729 ~ 753 に位置する。

30

#### 【0041】

好ましい実施形態において、M I D 4460 ポリペプチドまたはタンパク質は、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの「膜貫通ドメイン」、または少なくとも約 12 ~ 35 アミノ酸残基、より好ましくは約 14 ~ 30 アミノ酸残基もしくは 15 ~ 25 アミノ酸残基を含み、かつ「膜貫通ドメイン」（例えば、ヒト M I D 4460 の膜貫通ドメイン（例えば、配列番号 2 の残基 8 ~ 25 および 754 ~ 778））と少なくとも約 60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % の相同性を有する領域を有する。ヒト M I D 4460 の膜貫通ドメインは、ハイドロパシープロット（図 2）において、ハイドロパシートレースが、ほぼ水平線の上にある約 15 ~ 25 アミノ酸の領域として可視化される。

40

#### 【0042】

M I D 4460 タンパク質配列中の「膜貫通」ドメインの存在を同定し、かつ目的のポリペプチドまたはタンパク質が特定のプロファイルを有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、膜貫通推定方法により解析され得、この方法は、トポロジーモデルの認識に基づいて、内在性膜タンパク質の二次構造およびトポロジーを推定する（MEMSAT、Jones ら、（1994）Biochemistry 33: 3038 - 3049）。

#### 【0043】

M I D 4460 ポリペプチドは、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの「非膜貫通領域」

50

を含み得る。本明細書中で使用される場合、用語「非膜貫通領域」は、膜貫通ドメインとして同定されないアミノ酸配列を含む。M I D 4 4 6 0 中の非膜貫通領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 1 ~ 7 5 4 および約 7 7 8 ~ 1 1 1 8 に位置する。この非膜貫通領域は、細胞質または細胞外にあり得る。細胞外部分（配列番号 2 の約アミノ酸 1 ~ 7 5 4）は、接着分子として作用し得、特異的リガンドに結合し得、そして / または細胞間接触において重要であり得る。細胞質部分（配列番号 2 のアミノ酸約 7 7 8 ~ 1 1 1 8）は、触媒ドメインを含み得る。

#### 【0044】

M I D 4 4 6 0 の非膜貫通領域は、少なくとも 1 つの細胞質領域を含む。C 末端に位置する場合、この細胞質領域は、本明細書中において「C 末端細胞質ドメイン」と呼ばれる。本明細書中で使用される場合、「C 末端細胞質ドメイン」は、約 1 ~ 4 0 0 アミノ酸残基長、好ましくは約 1 ~ 3 7 5 アミノ酸残基長、より好ましくは約 1 ~ 3 5 0 アミノ酸残基長、またさらにより好ましくは約 1 ~ 3 4 0 アミノ酸残基長を有するアミノ酸配列を含み、細胞の内側または細胞の細胞質内に位置し、そして触媒ドメインを有する。「C 末端細胞質ドメイン」の N 末端アミノ酸残基は、M I D 4 4 6 0 タンパク質中の膜貫通ドメインの C 末端アミノ酸残基に隣接する。例えば、C 末端細胞質ドメインは、配列番号 2 のアミノ酸残基約 7 7 8 ~ 1 1 1 8 に位置する。

10

#### 【0045】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0 ポリペプチドまたはタンパク質は、C 末端細胞質ドメインまたは少なくとも約 3 0 0 アミノ酸残基、好ましくは約 3 0 0 ~ 4 0 0 アミノ酸残基、そしてより好ましくは約 3 0 0 ~ 3 5 0 アミノ酸残基を含み、そして「C 末端細胞質ドメイン」（例えば、ヒト M I D 4 4 6 0 の C 末端細胞質ドメイン（例えば、配列番号 2 の残基 7 7 8 ~ 1 1 1 8）と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % の相同性を有する領域を有する。

20

#### 【0046】

M I D 4 4 6 0 の非膜貫通領域は、少なくとも 1 つの細胞外領域を含む。N 末端に位置する場合、この細胞外領域は、本明細書中において「N 末端細胞外ドメイン」と呼ばれる。本明細書中で使用される場合、「N 末端細胞外ドメイン」は、約 1 ~ 8 0 0 アミノ酸残基長、好ましくは約 1 ~ 7 7 5 アミノ酸残基長、より好ましくは約 1 ~ 7 6 0 アミノ酸残基長、またはさらに好ましくは約 1 ~ 7 5 4 アミノ酸残基長を含み、細胞の内側または細胞の細胞質内に位置し、そして触媒ドメインを有する。「N 末端細胞外ドメイン」の C 末端アミノ酸残基は、M I D 4 4 6 0 タンパク質の膜貫通ドメインの N 末端アミノ酸残基に隣接する。例えば、N 末端細胞外ドメインは、配列番号 2 のアミノ酸残基約 1 ~ 7 5 4 に位置する。

30

#### 【0047】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0 ポリペプチドまたはタンパク質は、N 末端細胞外ドメイン、または約 1 ~ 8 0 0 アミノ酸残基長、好ましくは約 1 ~ 7 7 5 アミノ酸残基長、そしてより好ましくは約 1 ~ 7 5 0 アミノ酸残基長を有するアミノ酸配列を含み、そして「N 末端細胞外ドメイン」（例えば、ヒト M I D 4 4 6 0 の N 末端細胞外ドメイン（例えば、配列番号 2 のアミノ酸約 1 ~ 7 5 4））と少なくとも約 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 1 0 0 % の相同性を有する領域を有する。

40

#### 【0048】

ヒト M I D 4 4 6 0 タンパク質はさらに、ジロイシンモチーフ（例えば、配列番号 2 の残基 9 6 5 ~ 9 6 6、9 6 6 ~ 9 6 7、9 6 7 ~ 9 6 8、9 9 8 ~ 9 9 9、および 1 0 3 8 ~ 1 0 3 9）および / またはチロシン特異的タンパク質ホスファターゼ活性部位配列（例えば、配列番号 2 の残基 1 0 2 0 ~ 1 0 3 2）をさらに含み得る。

#### 【0049】

M I D 4 4 6 0 ファミリーメンバーは、少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、もしくは少なくとも 6 つのフィブロネクチン I I I 型ドメイン、または少なくとも 1 つのタンパク質チロシンホスファターゼドメイン、

50

あるいは膜貫通ドメインもしくは非膜貫通ドメインを含み得る。M I D 4 4 6 0 ファミリーメンバーは、少なくとも1つのチロシン特異的タンパク質ホスファターゼ活性部位配列 ( P r o s i t e P S 0 0 3 8 3 ) を含み得る。さらに、M I D 4 4 6 0 ファミリーメンバーは、以下を含み得る：少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、好ましくは少なくとも17のカゼインキナーゼI I リン酸化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 6 ) ；少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、好ましくは少なくとも9つのタンパク質キナーゼC リン酸化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 5 ) ；少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26および好ましくは27のN - グリコシル化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 1 ) ；少なくとも1つのc A M P / c G M P タンパク質キナーゼリン酸化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 4 ) ；少なくとも1つのチロシンキナーゼリン酸化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 7 ) ；ならびに少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、および好ましくは26のN - ミリスチル化部位 ( P r o s i t e P S 0 0 0 0 8 ) 。

10

20

30

#### 【 0 0 5 0 】

本発明のM I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、M I D 4 4 6 0 媒介活性を調節し得るので、これらは、以下に記載されるような、チロシンホスファターゼ関連障害または他のM I D 4 4 6 0 関連障害のための新規な診断剤および治療剤を開発するのに有用であり得る。

#### 【 0 0 5 1 】

本明細書中で使用される場合、「チロシンホスファターゼ関連活性」は、リン酸エステル結合の加水分解反応の触媒作用に関与する活性を含む。この活性はまた、ホスファターゼタンパク質と標的分子（例えば、リン酸化タンパク質またはペプチド）との相互作用に関与し得る。このファミリーのメンバーは、心臓血管疾患または新生物性疾患において役割を果たし得る。

#### 【 0 0 5 2 】

本明細書中で使用される場合、「M I D 4 4 6 0 活性」、「M I D 4 4 6 0 の生物学的活性」または「M I D 4 4 6 0 の機能的活性」とは、M I D 4 4 6 0 タンパク質、M I D 4 4 6 0 ポリペプチド、またはM I D 4 4 6 0 核酸分子により、例えば、インビボまたはインビトロで決定された場合のM I D 4 4 6 0 応答性細胞またはM I D 4 4 6 0 基質（例えば、タンパク質基質）に対して及ぼされる活性をいう。一実施形態において、M I D 4 4 6 0 活性は、直接的な活性（例えば、M I D 4 4 6 0 標的分子との結合）である。「標的分子」または「結合パートナー」は、天然においてM I D 4 4 6 0 タンパク質が結合するかまたは相互作用する分子である。例示的实施形態において、M I D 4 4 6 0 は、リン酸化基質のレセプターおよび酵素である。M I D 4 4 6 0 のレセプター部分へのリガンドの結合は、タンパク質のホスファターゼ活性を調節し得る。この酵素部分は、リン酸化アミノ酸残基（例えば、チロシン、スレオニン、またはセリン）を含む基質に結合し得、そしてホスホエステル結合の加水分解を触媒する。

40

50

## 【0053】

M I D 4460 活性はまた、間接的な活性（例えば、M I D 4460 タンパク質と M I D 4460 レセプターとの相互作用により媒介される細胞シグナル伝達活性）であり得る。上記の配列構造および既知の機能の分子に対する類似性に基づいて、本発明の M I D 4460 分子は、チロシンホスファターゼファミリーメンバーと同様の生物学的活性を有し得る。例えば、本発明の M I D 4460 タンパク質は、以下の活性の1つ以上を有し得る：（1）ホスホエステル結合の加水分解を触媒する能力；（2）リガンドに結合する能力；（3）リン酸化タンパク質を脱リン酸化する能力；（4）シグナル伝達を媒介する能力；および（5）接着分子として作用する能力。

## 【0054】

本発明の M I D 4460 分子は、M I D 4460 分子が発現される組織における細胞の活性を調節し得る。例えば、M I D 4460 m R N A は、肝臓、心臓、結腸、膵臓、脳、脾臓、および小腸において発現される。従って、本発明の M I D 4460 分子は、心臓血管障害、肝臓障害、胃腸管障害、または神経学的障害についての治療剤または診断剤として作用し得る。

## 【0055】

従って、M I D 4460 分子は、1つ以上の心臓血管障害または他のチロシンホスファターゼ障害を制御するための新規な診断標的および治療剤として作用し得る。本明細書中で使用される場合、「チロシンホスファターゼ障害」は、その病因が、異常かまたは欠損したチロシンホスファターゼタンパク質の機能または発現により引き起こされるか、関連するか、または付随する、疾患または障害である。このような障害（例えば、チロシンホスファターゼ関連障害または他の M I D 4460 関連障害）の例としては、細胞増殖性障害および/または細胞分化障害、免疫（例えば、炎症性）障害、心臓血管障害、内皮細胞障害、または肝臓障害が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0056】

細胞増殖性障害および/または細胞分化障害の例としては、癌（例えば、癌腫、肉腫、転移性障害または造血性新形成障害（例えば、白血病））が挙げられる。転移性腫瘍は、多数の原発性腫瘍型（前立腺起源、結腸起源、肺起源、乳房起源および肝臓起源の原発性腫瘍型を含むがこれらに限定されない）から生じ得る。

## 【0057】

この M I D 4460 分子は、心血管障害を処置するために使用され得、これは、部分的には、チロシンホスファターゼファミリーのメンバーが、心臓および肝臓において見出されるからである。この M I D 4460 は、アテローム性動脈硬化症と関連する脂質リスクファクター（例えば、H D L、L D L、トリグリセリド）の生合成に影響を与えるために使用され得る。本明細書中で使用される場合、心臓に関連する障害、すなわち「心血管疾患」または「心血管障害」としては、心血管系（例えば、心臓、血管、および/または血液）に影響を与える疾患もしくは障害が挙げられる。心血管障害は、動脈圧における不均衡、心臓の機能不全、または（例えば、血栓による）血管の閉塞によって、引き起こされ得る。心血管障害としては、例えば、以下のような障害が挙げられるが、これらに限定されない：動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、心肥大、虚血性再灌流傷害、再狭窄、動脈炎症、血管壁リモデリング、心室リモデリング、急速心室ペーシング、冠状微小塞栓症、頻拍、徐脈、圧力過剰負荷、大動脈屈曲、冠状動脈結紮、脈管心疾患、弁疾患（カルシウム沈着により引き起こされる弁変性、リウマチ性心疾患、心内膜炎、または人工弁の合併症が挙げられるが、これに限定されない）；心房細動、長 Q T 症候群、鬱血性心不全、洞房結節機能障害、アングナ、心不全、高血圧、心房細動、心房粗動、心膜疾患（心内膜液浸出および心内膜炎が挙げられるが、これらに限定されない）；心筋症（例えば、拡張型心筋症または特発性心筋症）、心筋梗塞、冠状動脈疾患、冠状動脈痙攣、虚血性疾患、不整脈、突然心臓死、ならびに心血管発生障害（例えば、動静脈先天異常、動静脈瘻、レーノー症候、神経性胸郭出口症候群、カウザルギー/反射性交感神経性ジストロフィー、血管腫、動脈瘤、海綿状血管腫、大動脈弁狭窄、心房中隔欠損、房室管、大動脈の縮窄、エ

10

20

30

40

50

ブスタイン異常、左心室発育不全症候群、大動脈弓の中断、僧帽弁逸脱、動脈管、卵円孔開存、部分的肺静脈還流異常、心室中隔欠損を伴う肺動脈閉鎖、心室中隔欠損を伴わない肺動脈閉鎖、胎児循環の存続、肺動脈弁狭窄、単心室、全肺静脈還流異常、大血管転位、三尖弁閉鎖、総動脈幹、心室中隔欠損)。心血管疾患または心血管障害としてはまた、内皮細胞障害も挙げられる。

#### 【0058】

本明細書中で使用される場合、用語「癌」(用語「過剰増殖」および「新形成」と互換可能にも使用される)とは、自律増殖能力を有する(すなわち、迅速に増殖する細胞増殖により特徴付けられる異常な状態または状況)細胞を指す。癌性疾患状態は、病的と分類され得る(すなわち、疾患状態(例えば、悪性腫瘍増殖)を特徴付けるかまたは構成する)か、あるいは、非病的と分類され得る(すなわち、正常ではないが疾患状態と関連はない、偏位(例えば、創傷修復と関連する細胞増殖)。この用語は、すべての型の癌性増殖または癌原性プロセス、転移性組織または悪性形質転換細胞、悪性形質転換組織、もしくは悪性形質転換器官(組織病理型にも侵襲性の段階にも関わらない)を包含することになっている。この用語「癌」は、種々の器官系の悪性疾患(例えば、肺を冒す悪性疾患、乳房を冒す悪性疾患、甲状腺を冒す悪性疾患、リンパ腺を冒す悪性疾患、胃腸管を冒す悪性疾患および尿生殖器管を冒す悪性疾患、ならびに腺癌(ほとんどの結腸癌、腎細胞癌腫、前立腺癌および/または精巣腫瘍、肺の非小細胞癌腫、小腸の癌および食道の癌のような悪性疾患を包含する)を包含する。用語「癌腫」は、当該分野で認識されており、そしてこの用語は、上皮組織もしくは内分泌組織の悪性疾患(呼吸器系癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖器系癌腫、精巣癌腫、乳房癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、および黒色腫を包含する)を指す。例示的癌腫としては、子宮頸部組織から形成する癌腫、肺組織から形成する癌腫、前立腺組織から形成する癌腫、乳房組織から形成する癌腫、頭部および頸部の組織から形成する癌腫、結腸組織から形成する癌腫、ならびに卵巣組織から形成する癌腫が挙げられる。用語「癌腫」はまた、例えば、癌性組織および肉腫性組織から構成される悪性腫瘍を含む、癌肉腫を包含する。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または認識可能な腺構造をその腫瘍細胞が形成する癌腫をさす。用語「肉腫」は当該分野で認識されており、この用語は、間葉由来物の悪性腫瘍を指す。

#### 【0059】

本発明のMID4460分子は、種々の増殖障害をモニター、処置、および/または診断するために使用され得る。そのような障害としては、造血性新形成障害が挙げられる。本明細書中で使用される場合、用語「造血性新形成障害」は、造血起源の(例えば、骨髄系列、リンパ系列、もしくは赤血球系列、またはそれらの前駆細胞から生じる)過形成細胞/新形成細胞に関与する疾患を包含する。好ましくは、その疾患は、ほとんど分化していない急性白血病(例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病)から生じる。さらなる例示的骨髄性障害としては、急性前骨髄球性白血病(APML)、急性骨髄性白血病(AML)および慢性骨髄性白血病(CML)(Vaickus(1991)Critt Rev. in Oncol. / Hemotol. 11. 267~97に概説される)が挙げられるが、これらに限定されない;リンパ球性悪性疾患としては、急性リンパ芽球性白血病(ALL)(B系列ALLおよびT系列ALLを包含する)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、前リンパ球性白血病(PLL)、毛様細胞白血病(HLL)、およびヴァルデンストレーママクログロブリン血症(WM)が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる悪性リンパ腫形態としては、非ホジキンリンパ腫およびその改変体、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、大型顆粒リンパ球白血病(LGF)、ホジキン病、およびリード-スターンバーグ病が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0060】

MID4460分子の異常な発現および/または異常な活性は、骨代謝に関係する障害を媒介し得る。「骨代謝」とは、骨構造の形成または変性(例えば、骨形成、骨再吸収など)における、血清中カルシウム濃度およびリン酸濃度に最終的に影響し得る、直接的効果

10

20

30

40

50



または間接的効果を指す。この用語はまた、骨細胞（例えば、破骨細胞および骨芽細胞）においてM I D 4 4 6 0分子により媒介され、その後骨形成および骨変性を生じ得る、活性を包含する。例えば、M I D 4 4 6 0分子は、骨再吸収破骨細胞の種々の活性（例えば、単球および単核食細胞から破骨細胞への分化の刺激）を支持し得る。従って、骨細胞の産生を調節するM I D 4 4 6 0分子は、骨形成および骨変性に影響し得、従って骨障害を処置するために使用され得る。そのような障害の例としては、骨粗鬆症、骨形成異常、骨軟化症、くる病、嚢胞性線維性骨炎、腎性骨形成異常、骨硬化、鎮痙処置、骨減少症、不完全骨線維形成（ossium）、続発性上皮小体機能亢進、上皮小体機能低下、上皮小体機能亢進、肝硬変、閉塞性黄疸、薬物誘発性代謝、髄様癌、慢性腎疾患、くる病、サルコイドーシス、グルココルチコイド拮抗、吸収不良症候群、脂肪便、熱帯性スプルー、特発性高カルシウム血症、および授乳熱が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0061】

本発明のM I D 4 4 6 0核酸およびM I D 4 4 6 0タンパク質は、種々の免疫（例えば、炎症（例えば、呼吸炎症））障害を処置および/または診断するために使用され得る。免疫障害または免疫疾患の例としては、自己免疫疾患（例えば、真性糖尿病、関節炎（慢性関節リウマチ、若年性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎を含む）、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎および湿疹性皮膚炎）、乾癬、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患（例えば、クローン病および潰瘍性大腸炎）、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、喘息、アレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾患、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳障害、特発性両側性進行性感音聴覚障害、再生不良性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少、多発性軟骨炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、ステューヴンズ-ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、および間質性肺線維症が挙げられる）、宿主対移植片病、移植症例、およびアレルギー（例えば、アトピー性アレルギー）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0062】

本明細書中で使用される場合、「内皮細胞障害」とは、異常な内皮細胞活性、調節されていない内皮細胞活性、または望ましくない内皮細胞活性（例えば、増殖、移動、新脈管形成、または血管新生）により特徴付けられる障害；あるいは細胞表面接着分子の異常な発現または新脈管形成に関連する遺伝子（例えば、T I E - 2、F L TおよびF L K）の異常な発現により特徴付けられる障害を包含する。内皮細胞障害としては、腫瘍形成、腫瘍転移、乾癬、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、グレーブス病、虚血性疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症）、および慢性炎症疾患（例えば、慢性関節リウマチ）が挙げられる。

30

#### 【0063】

本明細書中に記載される方法により処置または診断され得る障害としては、肝臓における線維組織の蓄積に係る障害（例えば、既存の線維の崩壊および縮合を伴う細胞外マトリックスの生成と分解との間の不均衡から生じる障害）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中に記載される方法は、広範な種類の因子により誘導される肝細胞壊死または肝細胞傷害（ホメオスタシスを破壊するプロセス（例えば、炎症性プロセス、毒性傷害から生じる組織損傷または肝血流の変化から生じる組織損傷）、ならびに感染（例えば、細菌感染、ウイルス感染、および寄生生物感染））を診断または処置するために使用され得る。例えば、その方法は、肝傷害（例えば、門脈圧亢進または肝線維症）の早期検出のために使用され得る。さらに、この方法は、先天性代謝異常に帰因する肝線維症（例えば、貯蔵障害（例えば、ゴシェ病（脂質異常）、またはグリコーゲン貯蔵病、A 1 - 抗トリプシン欠損）から生じる線維症）；外因性物質の蓄積（例えば、貯蔵）を媒介する障害（例えば、ヘモクロマトーシス（鉄過剰負荷症候群）および銅貯蔵病（ウィルソン病））、毒性代謝産物の蓄積を生じる障害（例えば、チロシン血症、果糖血症、およびガラクトース血症）、ならびにペルオキシソーム障害（例えば、ツェルヴェーガー症候群）を検

40

50

出するために使用され得る。さらに、本明細書中に記載される方法は、種々の化学物質または薬物（例えば、メトトレキサート、イソニアジド、オキシフェニサチン、メチルドパ、クロロプロマジン、トルブタミドまたはアルコール）の投与と関連する肝傷害、または脈管障害の肝徴候（例えば、肝臓内胆汁流もしくは肝臓外胆汁流のいずれかの閉塞、または例えば、慢性心不全、静脈閉塞疾患、門脈血栓症もしくはバッド・キアーリ症候群から生じる肝臓循環の変化）を示す肝傷害の早期検出および処置のために使用され得る。

【0064】

さらに、M I D 4 4 6 0 分子は、特定のウイルス疾患（B型肝炎、C型肝炎、および単純ヘルペスウイルス（H S V）が挙げられるが、これらに限定されない）の病因において重要な役割を果たし得る。M I D 4 4 6 0 活性の調節因子は、ウイルス疾患を制御するために使用され得る。この調節因子は、ウイルス感染組織またはウイルス関連組織線維症（特に、肝臓および肝臓線維症）の処置および／または診断において使用され得る。また、M I D 4 4 6 0 調節因子は、ウイルス関連癌腫（特に、肝細胞癌）の処置および／または診断において使用され得る。

10

【0065】

さらに、M I D 4 4 6 0 は、代謝障害または疼痛障害の調節において重要な役割を果たし得る。代謝不均衡の疾患としては、肥満、食欲不振、悪液質、脂質障害、および糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。疼痛障害の例としては、種々の形態の組織損傷の間に惹起される疼痛応答（例えば、炎症、感染、および虚血）（通常は、痛覚過敏と呼ばれる）（例えば、F i e l d s ( 1 9 8 7 ) P a i n , N e w Y o r k : M c G r a w - H i l l に記載される）；筋骨格障害に係する疼痛（例えば、関節痛）；歯痛；頭痛；手術に関連する疼痛；過敏性腸症候群に関連する疼痛；または胸部の疼痛が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0066】

M I D 4 4 6 0 タンパク質、そのフラグメント、および誘導体、ならびにその配列番号2の配列の他の改変体は、集合的に、「本発明のポリペプチドまたはタンパク質」あるいは「M I D 4 4 6 0 ポリペプチドまたはM I D 4 4 6 0 タンパク質」と呼ばれる。このようなポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸分子は、集合的に、「本発明の核酸」または「M I D 4 4 6 0 核酸」と呼ばれる。

【0067】

本明細書中で使用する場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびに例えばヌクレオチドアナログの使用により生成されるDNAアナログまたはRNAアナログを含む。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。

30

【0068】

用語「単離された核酸分子」または「精製された核酸分子」は、核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離された核酸分子を含む。例えば、ゲノムDNAに関して、用語「単離された」は、そのゲノムDNAが天然で結合している染色体から分離された核酸分子を含む。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸の由来となった生物のゲノムDNAにおいて、その核酸に天然で隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および／または3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態において、単離された核酸分子は、その核酸の由来となった細胞のゲノムDNAにおいて、天然でその核酸分子に隣接する、約5 kb、4 kb、3 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、または0.1 kb未満の5'側および／または3'側のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子（例えば、cDNA分子）は、他の細胞物質も、組換え技術により生成される場合には培養培地も実質的に含まないか、あるいは、化学合成される場合には化学物質前駆体も他の化学物質も実質的に含まない。

40

【0069】

本明細書中で使用される場合、用語「低ストリンジェンシー、中程度のストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または非常に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダ

50

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

10

#### 【0070】

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

20

#### 【0071】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、MID4460タンパク質(好ましくは、哺乳動物MID4460タンパク質)をコードする1つのオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。この遺伝子は、非コード調節配列およびイントロンをさらに含み得る。

#### 【0072】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはタンパク質は、そのタンパク質が得られた細胞または組織供給源由来の細胞物質も他の混入タンパク質も実質的に含まないか、あるいは化学合成された場合には化学物質前駆体も他の化学物質も実質的に含まない。1実施形態において、用語「実質的に含まない」は、約30%、20%、10%、およびより好ましくは、5%未満(乾燥重量)の、非MID4460タンパク質(本明細書中で「混入タンパク質」とも呼ばれる)または化学前駆体もしくは非MID4460化学物質を有する、MID4460タンパク質の調製物を意味する。MID4460タンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え生成される場合、それはまた、好ましくは、培養培地を実質的に含まない(すなわち、培養培地は、タンパク質調製物の量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す)。本発明は、乾燥重量で、少なくとも0.01mg、0.1mg、1.0mg、および10mgの単離された調製物または精製された調製物を含む。

30

40

#### 【0073】

「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を喪失すること、またより好ましくは実質的に変更することなく、MID4460の野生型配列から変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、そのような変化を生じる。例えば、本発明のポリペプチドにおいて保存されたアミノ酸残基(例えば、タンパク質チロシンホスファターゼドメインまたはフィブロネクチンドメイン中に存在するアミノ酸残基)は、変更に対して特に影響を受けやすいことが予想される。

#### 【0074】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で規

50

定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、M I D 4 4 6 0 タンパク質中の予測される非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同一側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、M I D 4 4 6 0 コード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入され得（例えば、飽和変異誘発によって）、そして得られる変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、M I D 4 4 6 0 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 または配列番号 3 の変異誘発の後、コードされるタンパク質は、組換え発現され得、そしてタンパク質の活性が、決定され得る。

10

#### 【0075】

本明細書中で使用される場合、M I D 4 4 6 0 タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、M I D 4 4 6 0 分子と非 M I D 4 4 6 0 分子との間の相互作用に関与する、M I D 4 4 6 0 タンパク質フラグメントを包含する。M I D 4 4 6 0 タンパク質の生物学的に活性な部分としては、全長 M I D 4 4 6 0 タンパク質より少ないアミノ酸を含みかつ M I D 4 4 6 0 タンパク質の少なくとも 1 つの活性を示す、M I D 4 4 6 0 タンパク質のアミノ酸配列に十分に相同であるかまたはそれに由来するアミノ酸配列（例えば、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列）を含むペプチドが挙げられる。代表的には、生物学的に活性な部分は、M I D 4 4 6 0 タンパク質の少なくとも 1 つの活性（例えば、ホスホエステル結合の加水分解を触媒する能力）を有するドメインまたはモチーフを含む。M I D 4 4 6 0 タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10 アミノ酸長、25 アミノ酸長、50 アミノ酸長、100 アミノ酸長、200 アミノ酸長以上であるポリペプチドであり得る。M I D 4 4 6 0 タンパク質の生物学的に活性な部分は、M I D 4 4 6 0 媒介活性（例えば、ホスホエステル結合の加水分解を触媒する能力）を調節する薬剤を開発するための標的として使用され得る。

20

30

#### 【0076】

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

#### 【0077】

2 つのアミノ酸配列、または 2 つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップが、最適な整列のために、第 1 および第 2 のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列は、比較目的で無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的で整列される参照配列の長さは、参照配列の少なくとも 30 %、好ましくは少なくとも 40 %、より好ましくは少なくとも 50 %、さらにより好ましくは 60 %、およびさらにより好ましくは少なくとも 70 %、80 %、90 %、100 % の長さである（例えば、1118 個のアミノ酸残基を有する配列番号 2 の M I D 4 4 6 0 アミノ酸配列に第 2 の配列を整列する場合、少なくとも 30 % のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも 40 % のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 50 % のアミノ酸残基、なおより好ましくは少なくとも 60 % のアミノ酸残基、そしてなおより好ましくは少なくとも 70 %、80 %、または 90 % 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 つの配列間の同一性パーセ

40

50

ントは、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である（２つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要のある、ギャップの数および各ギャップの長さが考慮される）。

#### 【００７８】

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

10

20

#### 【００７９】

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

#### 【００８０】

本明細書中に記載される核酸配列およびタンパク質配列は、「問い合わせ配列」として使用され、公開されたデータベースに対して（例えば、他のファミリーメンバーまたは関連肺列を同定するために）サーチが実施され得る。このようなサーチは、Altschulら（１９９０）J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を用いて実施され得る。BLASTヌクレオチドサーチは、NBLASTプログラム、スコア＝100、ワードレンクス＝12を用いて実施され得、本発明のMID4460核酸分子に対するヌクレオチド配列ホモログが獲得される。BLASTタンパク質サーチは、XBLASTプログラム、スコア＝50、ワードレンクス＝3を用いて実施され得、本発明のMID4460タンパク質分子のアミノ酸配列ホモログが獲得される。比較目的でギャップアラインメント（gapped alignment）を獲得するために、Gapped BLASTが、Altschulら（１９９７）Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載のように使用され得る。BLASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照のこと。

30

40

#### 【００８１】

本発明の特定のMID4460ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する。アミノ酸配列の文脈で、用語「実質的に同一」は、第1および第2のアミノ酸配列が、共通の構造的ドメインおよび/または共通の機能的活性を有し得るに十分な数または最小限の数の、i) 第2のアミノ酸配列における整列されたアミノ

50

酸残基と同一であるかまたは i i ) その保存的置換であるアミノ酸残基を含む第 1 のアミノ酸をいうように本明細書中で使用される。例えば、配列番号 2 に対して少なくとも約 60 %、または 65 % の同一性、おそらく、75 % の同一性、よりおそらくは 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する共通の構造的ドメインを含むアミノ酸配列は、実質的に同一であると言及される。

#### 【0082】

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

10

#### 【0083】

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

20

#### 【0084】

「被験体」は、本明細書中で使用される場合、哺乳動物（例えば、ヒト）、または実験モデルもしくは動物モデルもしくは疾患モデルを指し得る。この被験体はまた、非ヒト動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、または他の家畜動物）であり得る。

30

#### 【0085】

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

#### 【0086】

本発明の種々の局面は、以下でさらに詳細に記載される。

#### 【0087】

（単離された核酸分子）

40

1 つの局面において、本発明は、本明細書中に記載される MID 4460 ポリペプチド（例えば、全長 MID 4460 タンパク質またはそのフラグメント（例えば、MID 4460 タンパク質の生物学的に活性な部分））をコードする単離または精製された核酸分子を提供する。ハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに適した核酸フラグメント（これらは、例えば、本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を同定するために使用され得る）、MID 4460 mRNA、およびプライマー（例えば、核酸分子の増幅または変異のための PCR プライマー）として使用するのに適したフラグメントもまた含まれる。

#### 【0088】

1 つの実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号 1 に示されるヌクレ

50

オチド配列、またはこのヌクレオチド配列の任意の一部を含む。1つの実施形態において、この核酸分子は、ヒトM I D 4 4 6 0タンパク質をコードする配列（すなわち、配列番号3に示されるような、配列番号1の「コード領域」、配列番号3に示される）、ならびに5'非翻訳配列（配列番号1のヌクレオチド1～42）および3'非翻訳配列（配列番号1のヌクレオチド3399～3900）を含む。あるいは、この核酸分子は、配列番号1のコード領域（例えば、配列番号3）をのみを含み得、そして例えば、通常対象配列に付随する隣接配列を含まない。別の実施形態において、核酸分子は、配列番号2のアミノ酸約846～1080のタンパク質フラグメントに対応する配列をコードする。

#### 【0089】

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

10

#### 【0090】

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

20

#### 【0091】

（M I D 4 4 6 0核酸フラグメント）

本発明の核酸分子は、配列番号1または3の核酸配列の一部のみを含み得る。例えば、このような核酸分子は、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメントまたはM I D 4 4 6 0タンパク質の一部をコードするフラグメント（例えば、M I D 4 4 6 0タンパク質の免疫原性部分または生物学的に活性な部分）を含み得る。フラグメントは、ヒトM I D 4 4 6 0のタンパク質チロシンホスファターゼドメインまたはフィブロネクチンI I I型ドメインをコードする配列番号1のヌクレオチドを含み得る。M I D 4 4 6 0遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列により、他のM I D 4 4 6 0ファミリーメンバーまたはそのフラグメント、ならびに他の種由来のM I D 4 4 6 0ホモログまたはそのフラグメントを同定および/またはクローニングするのに使用するために設計されたプローブおよびプライマーが作製され得る。

30

#### 【0092】

別の実施形態において、核酸は、コード領域の一部または全てを含みかつ5'非コード領域非コード領域または3'非コード領域のいずれか（または両方）に延びる、ヌクレオチド配列を含む。他の実施形態は、本明細書中に記載されるアミノ酸フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本明細書中に記載される特定のドメインもしくは部位またはそのフラグメント（特に、少なくとも100アミノ酸長のそのフラグメント）をコードし得る。フラグメントはまた、上記の特定のアミノ酸配列に対応する核酸配列またはそのフラグメントを含む。核酸フラグメントは、本発明以前に開示されたかもしれないフラグメントを包含すると解釈されるべきでない。

40

#### 【0093】

核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるドメイン、領域、または機能的部位に対応する配列を含み得る。核酸フラグメントはまた、本明細書中に記載される1つ以上のドメイン、領域、または機能的部位を含み得る。従って、例えば、M I D 4 4 6 0核酸フラグメントは、本明細書中に記載されるような、タンパク質チロシンホスファターゼドメインまたはフィブロネクチンI I I型ドメインに対応する配列を含み得る。

#### 【0094】

M I D 4 4 6 0プローブおよびM I D 4 4 6 0プライマーが提供される。代表的に、プロ

50

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

#### 【0095】

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

10

#### 【0096】

プローブまたはプライマーは、配列番号 2 のアミノ酸およそ 1 ~ 25 からのシグナル配列をコードする核酸；配列番号 2 のアミノ酸およそ 1 ~ 754 もしくは 26 ~ 754 からの N 末端細胞外ドメインをコードする核酸；配列番号 2 のアミノ酸およそ 754 ~ 778 からの膜貫通ドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 778 ~ 1118 からの C 末端細胞質ドメインをコードする核酸；配列番号 2 のアミノ酸およそ 28 ~ 108、119 ~ 201、299 ~ 381、388 ~ 469、477 ~ 559、もしくは 567 ~ 656 からのフィブロネクチン III 型ドメインをコードする核酸；配列番号 2 のアミノ酸およそ 846 ~ 1080、977 ~ 1080、もしくは 821 ~ 1083 からのタンパク質チロシンホスファターゼドメインをコードする核酸の、センス鎖またはアンチセンス鎖に由来し得る。

20

#### 【0097】

別の実施形態において、MID4460 配列の選択された領域（例えば、本明細書中に記載されるドメイン、領域、部位、または他の配列）を増幅するために使用され得る 1 組のプライマー（例えば、PCR において使用するのに適切なプライマー）が、提供される。そのプライマーは、長さが少なくとも 5 塩基対、10 塩基対、もしくは 50 塩基対であり、かつ 100 塩基対未満もしくは 200 塩基対未満であるべきである。そのプライマーは、本明細書中に開示される配列または天然に存在する改変体と、同一であるかまたは 1 塩基異なるべきである。例えば、以下の領域のうちのいずれかのすべてまたは一部を増幅するために適切なプライマーが、提供される：配列番号 2 のアミノ酸およそ 778 ~ 1118 からの細胞質ドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 754 ~ 778 からの膜貫通ドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 1 ~ 754 もしくは 26 ~ 754 からの細胞外ドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 26 ~ 1118 からの成熟タンパク質；配列番号 2 のアミノ酸およそ 821 ~ 1083 からのタンパク質チロシンホスファターゼドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 977 ~ 1080 からのタンパク質チロシンホスファターゼドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 846 ~ 1080 からのタンパク質チロシンホスファターゼドメイン；配列番号 2 のアミノ酸およそ 30 ~ 109、119 ~ 198、299 ~ 378、388 ~ 467、477 ~ 556、もしくは 567 ~ 657 からのフィブロネクチン III 型ドメイン。

30

40

#### 【0098】

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

#### 【0099】

「MID4460 ポリペプチドの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド配列の一部を単離すること（このヌクレ

50



オチド配列は、M I D 4 4 6 0 生物学的活性を有するポリペプチドをコードする（例えば、M I D 4 4 6 0 タンパク質の生物学的活性が、本明細書中に記載されている）、M I D 4 4 6 0 タンパク質のコード部分を（例えば、インビトロにおける組換え発現によって）発現すること、およびM I D 4 4 6 0 タンパク質のコード部分の活性を評価することによって、調製され得る。例えば、M I D 4 4 6 0 の生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、タンパク質チロシンホスファターゼドメイン（例えば、配列番号2のアミノ酸残基のおよそ846～1080）を含む。M I D 4 4 6 0 ポリペプチドの生物学的に活性な活性部分をコードする核酸フラグメントは、300ヌクレオチド以上の長さを超えるヌクレオチド配列を含み得る。

#### 【0100】

好ましい実施形態において、核酸は、約300ヌクレオチド長、400ヌクレオチド長、500ヌクレオチド長、600ヌクレオチド長、700ヌクレオチド長、800ヌクレオチド長、900ヌクレオチド長、1000ヌクレオチド長、1100ヌクレオチド長、1200ヌクレオチド長、1300ヌクレオチド長、1400ヌクレオチド長、1500ヌクレオチド長、1600ヌクレオチド長、1700ヌクレオチド長、1800ヌクレオチド長、1900ヌクレオチド長、2000ヌクレオチド長、2100ヌクレオチド長、2200ヌクレオチド長、2300ヌクレオチド長、2400ヌクレオチド長、2500ヌクレオチド長、2600ヌクレオチド長、2700ヌクレオチド長、2800ヌクレオチド長、2900ヌクレオチド長、3000ヌクレオチド長、3100ヌクレオチド長、3200ヌクレオチド長、3300ヌクレオチド長、3400ヌクレオチド長、3500ヌクレオチド長、3600ヌクレオチド長、3700ヌクレオチド長、3800ヌクレオチド長、3900ヌクレオチド長以上でありかつ配列番号1または配列番号3の核酸分子に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含む。

#### 【0101】

（M I D 4 4 6 0 核酸改変体）

本発明は、さらに、配列番号1または配列番号3に示されるヌクレオチド配列と異なる核酸分子を含む。このような差異は、遺伝的コードの縮重に起因し得、そして本明細書中に開示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同一のM I D 4 4 6 0 タンパク質をコードする核酸を生じる。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2に示されるアミノ酸残基が少なくとも1個であるが、5個未満、10個未満、20個未満、50個未満、または100個未満異なる、アミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。アライメントが、この比較に必要とされる場合、この配列は、最大の相同性について整列されるべきである。欠失もしくは挿入からの「ループ」アウト配列、またはミスマッチは、差異とみなされる。

#### 【0102】

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

#### 【0103】

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

#### 【0104】

好ましい実施形態において、核酸は、例えば、以下のように配列番号1または配列番号3

10

20

30

40

50

の核酸と異なる：少なくとも1ヌクレオチド異なるが、10ヌクレオチド未満、20ヌクレオチド未満、30ヌクレオチド未満、または40ヌクレオチド未満異なる；少なくとも1ヌクレオチド異なるが、目的の核酸の1%ヌクレオチド未満、5%ヌクレオチド未満、10%ヌクレオチド未満または20%ヌクレオチド未満異なる。分析の必要性がある場合、この配列は、最大の相同性について整列されるべきである。欠失もしくは挿入からの「ループ」アウト配列、またはミスマッチは、差異とみなされる。

#### 【0105】

オルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体は、当該分野で公知の方法を使用して同定され得る。これらの改変体は、配列番号2に示されるヌクレオチド配列またはその配列のフラグメントに対して、50%、少なくとも約55%、代表的に、少なくとも約70~75%、より代表的に、少なくとも約80~85%、そして最も代表的に、少なくとも約90~95%以上、同一である、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような核酸分子は、配列番号2に示されるヌクレオチド配列またはその配列のフラグメントに対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るとして、容易に同定され得る。本発明のMID4460 cDNAのオルソログ、ホモログ、および対立遺伝子改変体に対応する核酸分子は、MID4460遺伝子と同一の染色体または遺伝子座にマッピングすることによって、さらに単離され得る。

10

#### 【0106】

好ましい改変体は、基質のリン酸エステル結合の加水分解を触媒する能力またはリガンドと結合する能力と関連する改変体を包含する。

20

#### 【0107】

MID4460の対立遺伝子改変体（例えば、ヒトMID4460）は、機能性タンパク質または非機能性タンパク質の両方を包含する。機能性対立遺伝子改変体は、リン酸エステル結合の加水分解を触媒する能力またはリガンドに結合する能力を維持する集団中にある、MID4460タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。機能性対立遺伝子改変体は、代表的には、配列番号2の1個以上のアミノ酸の保存的置換のみ、またはそのタンパク質の非重要領域にある非重要残基の置換、欠失もしくは挿入を含む。非機能性対立遺伝子改変体は、リン酸エステル結合の加水分解を触媒する能力もリガンドに結合する能力を維持するも有さない集団中にある、MID4460（例えば、ヒトMID4460）タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。非機能性対立遺伝子改変体は、代表的には、配列番号2のアミノ酸配列の非保存的置換、非保存的欠失、もしくは非保存的挿入、または成熟前切断、あるいはそのタンパク質の重要な残基または重要な領域の置換、挿入、または欠失を含む。

30

#### 【0108】

さらに、他のMID4460ファミリーメンバーをコードする核酸分子（従って、配列番号1または配列番号3のMID4460配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子）は、本発明の範囲内であることが意図される。

#### 【0109】

（アンチセンス核酸分子、リボザイムおよび改変されたMID4460核酸分子）  
別の局面において、本発明は、MID4460に対してアンチセンスである単離された核酸分子を特徴とする。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的である（例えば、二重鎖cDNA分子のコード鎖に対して相補的であるか、またはmRNA配列に対して相補的である）、ヌクレオチド配列を含み得る。このアンチセンス核酸は、全MID4460コード鎖、またはその一部のみ（例えば、配列番号3に対応する、ヒトMID4460のコード領域）に対して相補的であり得る。別の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、MID4460をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」（例えば、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域）に対してアンチセンスである。

40

#### 【0110】

MID4460 mRNAの全コード領域に対して相補的であるように、アンチセンス核酸

50

が、設計され得るが、より好ましくは、M I D 4 4 6 0 m R N A のコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、M I D 4 4 6 0 m R N A の翻訳開始部位を取り囲む領域（例えば、目的の標的遺伝子ヌクレオチド配列の - 1 0 領域と + 1 0 領域との間）に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約 7 ヌクレオチド長、1 0 ヌクレオチド長、1 5 ヌクレオチド長、2 0 ヌクレオチド長、2 5 ヌクレオチド長、3 0 ヌクレオチド長、3 5 ヌクレオチド長、4 0 ヌクレオチド長、4 5 ヌクレオチド長、5 0 ヌクレオチド長、5 5 ヌクレオチド長、6 0 ヌクレオチド長、6 5 ヌクレオチド長、7 0 ヌクレオチド長、7 5 ヌクレオチド長、8 0 ヌクレオチド長以上であり得る。

10

#### 【 0 1 1 1 】

本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用する化学合成反応および酵素的ライゲーション反応を使用して、構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増加もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二重鎖の物理学的安定性を増加させるように設計された多様に改変されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが、使用され得る）。アンチセンス核酸がまた、核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされた発現ベクターを生物学的に使用して産生され得る（すなわち、挿入された核酸から転写される R N A は、以下の小節でさらに記載されている、目的の標的核酸に対してアンチセンス配向である）。

20

#### 【 0 1 1 2 】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的に、（例えば、組織部位での直接的な注入によって）被験体に投与されるか、またはこれらのアンチセンス核酸分子が、M I D 4 4 6 0 タンパク質をコードする細胞性 m R N A および / またはゲノム D N A とハイブリダイズするかまたは結合することによって、例えば、転写および / または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害するように、インサイチュで産生される。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞が標的され得、次いで、全身に投与され得る。全身投与に関して、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、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もしくは選択的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力な p o l I I プロモーターまたは p o l 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、好ましい。

30

#### 【 0 1 1 3 】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 - アノマー核酸分子である。 - アノマー核酸分子は、相補的 R N A 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 - ユニットとは対照的に、鎖は互いに対して平行に延びる（G a u l t i e r ら（1987）N u c l e i c A c i d s R e s . 1 5 : 6 6 2 5 - 6 6 4 1）。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（I n o u e ら（1987）N u c l e i c A c i d s R e s . 1 5 : 6 1 3 1 - 6 1 4 8）またはキメラ R N A - D N A アナログ（I n o u e ら（1987）F E B S L e t t . 2 1 5 : 3 2 7 - 3 3 0）を含み得る。

40

#### 【 0 1 1 4 】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸は、リボザイムである。M I D 4 4 6 0 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 M I D 4 4 6 0 c D N A のヌクレオチド配列（すなわち、配列番号 1 または配列番号 3）に対して相補的な 1 以上の配列、ならびに m R N A の切断を担う公知の触媒配列を有する配列（米国特許第 5 , 0 9 3 , 2 4 6 号または H a s e l h o f f および G e r l a c h（1

50

988) Nature 334: 585 - 591を参照のこと)を含み得る。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MID4460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、MID4460 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。

#### 【0115】

MID4460遺伝子の発現は、標的細胞中でMID4460遺伝子の転写を阻害する三重ヘリックス構造を形成するために、MID4460の調節領域に相補的なヌクレオチド配列(例えば、MID4460プロモーターまたはMID4460エンハンサー)を標的にすることによって阻害され得る。一般に、Helene (1991) Anticancer Drug Des. 6: 569 - 84; Helene (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27 - 36; およびMaher (1992) Bioassays 14: 807 - 15を参照のこと。三重ヘリックスの形成のために標的され得る潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加され得る。スイッチバック分子は、交互に5', 3', 3', 5'様式で合成され、これらは、二重鎖の一方の鎖と、次いで他方の鎖と塩基対形成し、プリンまたはピリミジンのいずれかのかなり大きなストレッチが、二重鎖の一方の鎖上に存在することの必要性を排除する。

10

20

#### 【0116】

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

#### 【0117】

MID4460核酸分子を、塩基部分、糖部分またはホスフェート骨格において改変し、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースホルフェート骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る(Hyrupら(1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4: 5 - 23を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースホスフェート骨格がシュードペプチド骨格により置換され、そして4つの天然の核酸塩基(nucleobase)のみが保持されている、核酸模倣物(例えば、DNA模倣物)をいう。PNAの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下で、DNAおよびRNAに対する特異的なハイブリダイゼーションを可能にし得る。PNAオリゴマーの合成は、Hyrupら(1996)前出、およびPerry-O'Keefeら、Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670 - 675に記載のような、標準的固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施され得る。

30

#### 【0118】

MID4460核酸分子のPNAは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、遺伝子発現の配列特異的調節(例えば、転写または翻訳の停止を誘導すること、または複製を阻害することによる)のためのアンチセンス剤またはアンチジーン剤として使用され得る。MID4460核酸分子のPNAはまた、例えば、PNA指向PCRクランピング(PNA-directed PCR clamping)による遺伝子内の一塩基対変異の分析において、他の酵素(例えば、S1ヌクレアーゼ)と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として(Hyrup(1996)、前出);またはDNA配列決定またはハイブリダイゼーションのプローブまたはプライマーとして(Hyrupら(1996)、前出; Perry-O'Keefeら(1996)、前出)使用され得る。

40

#### 【0119】

50

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基（例えば、インビボにおける宿主細胞レセプターを標的するため）、または細胞膜を通過する輸送を容易にする薬剤（例えば、L e t s i n g e r ら、( 1 9 8 9 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 6 : 6 5 5 3 - 6 5 5 6 ; L e m a i t r e ら ( 1 9 8 7 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 6 4 8 - 6 5 2 ; P C T 公開番号 W O 8 8 / 0 9 8 1 0 を参照のこと）もしくは血液脳関門を通過する輸送を容易にする薬剤（例えば、P C T 公開番号 W O 8 9 / 1 0 1 3 4 を参照のこと）を通過する輸送を容易にする試薬を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発性切断薬剤（例えば、K r o l ら ( 1 9 8 8 ) B i o - T e c h n i q u e s 6 : 9 5 8 - 9 7 6 を参照のこと）、挿入剤（例えば、Z o n ( 1 9 8 8 ) P h a r m . R e s . 5 : 5 3 9 - 5 4 9 を参照のこと）を用いて改変され得る。この目的のために、このオリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤）に結合体化され得る。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 2 0 】

本発明はまた、本発明の M I D 4 4 6 0 核酸に対して相補的である少なくとも一つの領域を有する、分子ビーコンオリゴヌクレオチドプライマー分子およびプローブ分子を含み、2つの相補的な領域は、一つは蛍光団を有し、そして一つは、クエンチャーを有し、その結果、この分子ビーコンは、サンプル中で本発明の M I D 4 4 6 0 核酸の存在を定量するために有用である。分子ビーコン核酸は、例えば、L i z a r d i ら、米国特許第 5 , 8 5 4 , 0 3 3 号 ; N a z a r e n k o ら、米国特許第 5 , 8 6 6 , 3 3 6 号、および L i v a k ら、米国特許第 5 , 8 7 6 , 9 3 0 号に記載されている。

#### 【 0 1 2 1 】

（単離された M I D 4 4 6 0 ポリペプチド）

別の局面において、本発明は、抗 M I D 4 4 6 0 抗体を惹起するかまたは試験する（またはより一般的には、この抗体に結合する）ための免疫原または抗原として使用するための、単離された M I D 4 4 6 0 タンパク質、またはフラグメント（例えば、生物学的に活性な部分）を特徴とする。M I D 4 4 6 0 タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用して、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。M I D 4 4 6 0 タンパク質またはそのフラグメントを、組換え D N A 技術によって産生し得るかまたは化学的に合成し得る。

#### 【 0 1 2 2 】

本発明のポリペプチドは、複数の遺伝子の存在の結果、選択的転写事象、選択的 R N A スプライシング事象、ならびに代替の翻訳事象および翻訳後事象を惹起するポリペプチドを含む。ポリペプチドは、ポリペプチドがネイティブ細胞中で発現される場合に存在するのと実質的に同一の翻訳後改変を生じる系（例えば、培養細胞）中で発現され得るか、または系においてネイティブ細胞中に存在する翻訳後修飾（例えば、グリコシル化または切断）の変化または欠如を生じる。

#### 【 0 1 2 3 】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、以下の特徴の一つ以上を有する：

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、リン酸エステル結合の加水分解を触媒する能力、リガンドに結合する能力、M I D 4 4 6 0 標的タンパク質を脱リン酸する能力、シグナル伝達する能力、H D L レベルを上昇させる能力、L D L レベルを低下させる能力、およびアテローム性動脈硬化症を減少させる能力を有する；

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、M I D 4 4 6 0 ポリペプチド（例えば、配列番号 2 のポリペプチド）の、翻訳後修飾、アミノ酸組成または他の物理学的特性のいかなる寄与も無視する分子量（例えば、推定分子量）を有する；

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、配列番号 2 のポリペプチドと、少なくとも 6 0 %、好ましくは少なくとも 7 0 %、より好ましくは少なくとも 8 0 %、9 0 %、または 9 5 % の全体的配列類似性を有する；

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、少なくとも以下のヒト組織および細胞株で発現され、肝臓および結腸において高レベルで発現され、心臓、膵臓、脳、脾臓、および小腸において中程度のレベルで発現される；

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基およそ 8 4 6 ~ 1 0 8 0 と好ましくは約 7 0 %、8 0 %、9 0 % または 9 5 % 同一である、タンパク質チロシンホスファターゼドメインを有する；

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸残基およそ 2 8 ~ 1 0 8、1 1 9 ~ 2 0 1、2 9 9 ~ 3 8 1、3 8 8 ~ 4 6 9、4 7 7 ~ 5 5 9、または 5 6 7 ~ 6 5 6 と好ましくは約 7 0 %、8 0 %、9 0 %、もしくは 9 5 % 同一である、フィブロネクチン I I I 型ドメインを有する；そして

M I D 4 4 6 0 ポリペプチドは、ネイティブタンパク質のアミノ酸配列において見出されるシステインのうちの少なくとも 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、1 0 個、1 1 個、1 2 個、1 3 個、1 4 個、1 5 個、1 6 個、1 7 個、好ましくは 1 8 個、最も好ましくは 1 9 個を有する。

10

#### 【 0 1 2 4 】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0 タンパク質またはそのフラグメントは、配列番号 2 の対応する配列と異なる。一つの実施形態において、M I D 4 4 6 0 タンパク質またはそのフラグメントは、少なくとも 1 個だが、1 5 個未満、1 0 個未満または 5 個未満のアミノ酸残基だけ異なる。別の実施形態において、M I D 4 4 6 0 タンパク質またはそのフラグメントは、少なくとも 1 残基だが、その残基の 2 0 % 未満、1 5 % 未満、1 0 % 未満、または 5 % 未満の残基だけ、配列番号 2 の対応する配列と異なり、これは、配列番号 2 の対応する配列と異なる。（この比較が、アライメントを必要とする場合、これらの配列は、最大相同性について整列されるべきである。欠失もしくは挿入からの「ループ」アウト配列またはミスマッチが、差異とみなされる）。この差異は、好ましくは、非必須残基での差異もしくは変化、または保存的置換である。好ましい実施形態において、この差異は、配列番号 2 の残基およそ 8 4 6 ~ 1 0 8 0 のタンパク質チロシンホスファターゼドメインの差異でも、配列番号 2 の残基およそ 2 8 ~ 1 0 8、1 1 9 ~ 2 0 1、2 9 9 ~ 3 8 1、3 8 8 ~ 4 6 9、4 7 7 ~ 5 5 9、もしくは 5 6 7 ~ 6 5 6 のフィブロネクチン I I I 型ドメインでの差異でも、配列番号 2 の残基およそ 7 5 4 ~ 7 7 8 の膜貫通ドメインでの差異でも、配列番号 2 の残基およそ 1 ~ 7 5 4 の細胞外ドメインでの差異でも、配列番号 2 の残基およそ 7 7 8 ~ 1 1 1 9 の細胞内ドメインでの差異でもない。別の実施形態において、1 以上の差異が、配列番号 2 の残基およそ 8 4 6 ~ 1 0 8 0 のタンパク質チロシンホスファターゼドメインの差異、配列番号 2 の残基およそ 2 8 ~ 1 0 8、1 1 9 ~ 2 0 1、2 9 9 ~ 3 8 1、3 8 8 ~ 4 6 9、4 7 7 ~ 5 5 9、もしくは 5 6 7 ~ 6 5 6 のフィブロネクチン I I I 型ドメインでの差異、配列番号 2 の残基およそ 7 5 4 ~ 7 7 8 の膜貫通ドメインでの差異、配列番号 2 の残基およそ 1 ~ 7 5 4 の細胞外ドメインでの差異、または配列番号 2 の残基およそ 7 7 8 ~ 1 1 1 8 の細胞内ドメインでの差異である

20

30

他の実施形態は、アミノ酸配列の一つ以上の変化（例えば、活性に関して本質的ではないアミノ酸残基の変化）を含有するタンパク質を含む。このような M I D 4 4 6 0 タンパク質は、配列番号 2 由来のアミノ酸配列において異なるが、なお生物学的活性を保持する。

40

#### 【 0 1 2 5 】

一つの実施形態において、このタンパク質は、配列番号 2 に対して、少なくとも約 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 % 以上の相同性のアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 1 2 6 】

M I D 4 4 6 0 タンパク質またはフラグメントにおいて、少なくとも 1 個のアミノ酸残基、1 5 個、1 0 個または 5 個未満のアミノ酸残基だけ配列番号 2 のアミノ酸の約 1 ~ 8 4 6 または 1 0 8 0 ~ 1 1 1 8 によって規定される領域において、配列番号 2 の配列と異なるが、アミノ酸残基の約 8 4 6 ~ 1 0 8 0 によって規定される領域において、配列番号

50

2と異なる、M I D 4 4 6 0タンパク質またはフラグメントが、提供される。(この比較が、アライメントを必要とする場合、この配列は、最大相同性についてアライメントされるべきである。欠失もしくは挿入、またはミスマッチ由来の「ループ」アウト配列が、差異とみなされる)。いくつかの実施形態において、この差異は、非必須残基にあるか、または保存的置換にある一方で、この差異は、必須残基にあるか、または非保存的置換にある。

#### 【0127】

一つの実施形態において、M I D 4 4 6 0タンパク質の生物学的に活性な部分は、タンパク質-チロシンホスファターゼドメインを含む。さらに、他の生物学的に活性な部分(ここで、タンパク質の他の領域は、欠失される)は、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブM I D 4 4 6 0タンパク質の機能的な活性の1以上について評価され得る。

10

#### 【0128】

好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0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、M I D 4 4 6 0タンパク質は、配列番号2と十分に同一または実質的に同一である。なお別の実施形態において、M I D 4 4 6 0タンパク質は、上記の節で詳細に記載したような、配列番号2と十分に同一または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な活性を保持する。

#### 【0129】

(M I D 4 4 6 0キメラタンパク質または融合タンパク質)

20

別の局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0キメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、M I D 4 4 6 0「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非M I D 4 4 6 0ポリペプチドに連結したM I D 4 4 6 0ポリペプチドを含む。「非M I D 4 4 6 0ポリペプチド」は、M I D 4 4 6 0タンパク質と実質的に相同性でないタンパク質(例えば、M I D 4 4 6 0タンパク質と異なるタンパク質)および同一の生物または異なる生物由来のタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。融合タンパク質のM I D 4 4 6 0ポリペプチドは、全てまたは一部(例えば、本明細書中に記載のM I D 4 4 6 0アミノ酸配列のフラグメント)に対応し得る。好ましい実施形態において、M I D 4 4 6 0融合タンパク質は、M I D 4 4 6 0タンパク質の少なくとも1個(または2個)の生物学的に活性な部分を含む。非M I D 4 4 6 0ポリペプチドは、M I D 4 4 6 0ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

30

#### 【0130】

この融合タンパク質は、リガンドに対して高度の親和性を有する部分を含み得る。例えば、この融合タンパク質は、M I D 4 4 6 0配列がG S T配列のC末端に対して融合される、G S T-M I D 4 4 6 0融合タンパク質であり得る。このような融合タンパク質は、組換えM I D 4 4 6 0の精製を容易にし得る。あるいは、この融合タンパク質は、そのN末端において、異種シグナル配列を含むM I D 4 4 6 0タンパク質であり得る。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物の宿主細胞)において、M I D 4 4 6 0の発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増強され得る。

40

#### 【0131】

融合タンパク質は、血清タンパク質のすべてまたは一部(例えば、免疫グロブリン(例えば、I g G、I g AまたはI g E)の一部(例えば、免疫グロブリンのF c領域ならびに/またはヒンジC1およびヒンジC2の配列)またはヒト血清アルブミン)を含み得る。

#### 【0132】

本発明のM I D 4 4 6 0融合タンパク質は、薬学的組成物に取り込まれ得、そしてインビボで被験体に投与され得る。M I D 4 4 6 0融合タンパク質は、M I D 4 4 6 0基質のバイオアベイラビリティに影響を与えるために使用され得る。M I D 4 4 6 0融合タンパク質は、例えば、以下の(i)、(ii)および(iii)によって生じる障害の処置のために治療学的に有用であり得る：(i)M I D 4 4 6 0タンパク質をコード

50

する遺伝子の異常な改変または変異；( i i ) M I D 4 4 6 0 遺伝子の誤調節；および ( i i i ) M I D 4 4 6 0 タンパク質の異常な翻訳後改変。

【 0 1 3 3 】

さらに、本発明の M I D 4 4 6 0 融合タンパク質は、被験体において抗 M I D 4 4 6 0 抗体を産生して、M I D 4 4 6 0 リガンドを精製するための免疫原として使用され得、そして M I D 4 4 6 0 と M I D 4 4 6 0 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。

【 0 1 3 4 】

融合部分（例えば、G S T ポリペプチド）をすでにコードする発現ベクターが、市販されている。M I D 4 4 6 0 をコードする核酸は、このような発現ベクター中にクローニングされ得、その結果、融合部分が M I D 4 4 6 0 タンパク質にインフレームで連結される。

【 0 1 3 5 】

( M I D 4 4 6 0 タンパク質の改変体 )

別の局面において、本発明はまた、M I D 4 4 6 0 ポリペプチドの改変体（例えば、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストとして機能する）を特徴とする。M I D 4 4 6 0 タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、不連続な点変異）、配列の挿入もしくは欠失、または M I D 4 4 6 0 タンパク質の短縮 ( t r u n c a t i o n ) によって作製され得る。M I D 4 4 6 0 タンパク質のアゴニストは、M I D 4 4 6 0 タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同一の活性またはサブセットを残存し得る。M I D 4 4 6 0 タンパク質のアンタゴニストは、例えば、M I D 4 4 6 0 タンパク質の M I D 4 4 6 0 媒介活性を競合的に調節することによって、M I D 4 4 6 0 タンパク質の天然に存在する形態の活性の 1 つ以上を阻害し得る。よって、特定の生物学的効果は、種々の限定された機能を用いる処置によって誘導され得る。好ましくは、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、M I D 4 4 6 0 タンパク質の天然に存在する形態での処置と比較して被験体においてわずかな副作用を有する。

【 0 1 3 6 】

M I D 4 4 6 0 タンパク質の改変体は、M I D 4 4 6 0 タンパク質の変異体（例えば、短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーをアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定され得る。

【 0 1 3 7 】

M I D 4 4 6 0 タンパク質をコードする配列のフラグメント（例えば、N 末端フラグメント、C 末端フラグメントまたは内部フラグメント）のライブラリーを使用して、M I D 4 4 6 0 タンパク質の改変体のスクリーニング、続く選択のための多様なフラグメント集団を作製し得る。

【 0 1 3 8 】

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

【 0 1 3 9 】

点変異または短縮によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする方法、および選択された特性を有する遺伝子産物について c D N A ライブラリーをスクリーニングするための方法が、当該分野において公知である。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を高める新たな技術である再帰的アンサンブル変異誘発 ( r e c u r s i v e e n s e m b l e m u t a g e n e s i s ) ( R E M ) をスクリーニングアッセイと組合わせて使用して、M I D 4 4 6 0 改変体を同定し得る ( A r k i n および Y o u r v a n ( 1 9 9 2 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 9 : 7 8 1 1 - 7 8 1 5 ; D e l g r a v e ら ( 1 9 9 3 ) P r o t e i n E n g i n e e r i n g 6 : 3 2 7 - 3 3 1 ) 。

【 0 1 4 0 】



多様な M I D 4460 ライブラリーを分析するために、細胞ベースのアッセイが利用され得る。例えば、発現ベクターのライブラリーが、細胞株（例えば、通常、基質依存的様式で M I D 4460 に応答する細胞株）にトランスフェクトされ得る。次いで、トランスフェクトされた細胞は、M I D 4460 と接触させられ、そして M I D 4460 基質によるシグナル伝達に対する変異体発現の効果が、（例えば、ペプチドまたはタンパク質のような基質におけるリン酸エステル結合の加水分解を測定することによって）検出され得る。次いで、プラスミド D N A は、M I D 4460 基質によるシグナル伝達の阻害または増強を記録する細胞から回収され得、そして個々のクローンがさらに特徴付けられ得る。

#### 【0141】

別の局面において、本発明は、M I D 4460 ポリペプチド（例えば、非野生型活性を有するペプチド、例えば、天然に存在する M I D 4460 ポリペプチドのアンタゴニスト、アゴニストもしくはスーパーアゴニスト、例えば、天然に存在する M I D 4460 ポリペプチド）を作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：M I D 4460 ポリペプチドの配列を変更する工程（例えば、本明細書中に開示される非保存領域、ドメインまたは残基の1つ以上の残基の置換または欠失によって配列を変更する工程）；および所望の活性について変更されたポリペプチドを試験する工程。

10

#### 【0142】

別の局面において、本発明は、天然に存在する M I D 4460 ポリペプチドの生物学的活性を有する M I D 4460 ポリペプチドのフラグメントまたはアナログを作製する方法を特徴とする。本方法は、以下の工程を包含する：例えば、1つ以上の残基の置換または欠失によって M I D 4460 ポリペプチドの配列を変更する工程（例えば、本明細書中に記載される非保存領域の配列またはドメインもしくは残基を変更する工程）；および、所望の活性について変更されたポリペプチドを試験する工程。

20

#### 【0143】

（抗 M I D 4460 抗体）

別の局面において、本発明は、抗 M I D 4460 抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子またはその免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原結合部分）をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、s c F V フラグメントおよび d c F V フラグメント、F a b フラグメントおよび F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント（これらのフラグメントは、それぞれ、パパインまた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）が挙げられる。

30

#### 【0144】

抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体（例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体、完全ヒト抗体、非ヒト抗体（例えば、マウス抗体））または単鎖抗体であり得る。好ましい実施形態において、抗体は、エフェクター機能を有し、そして補体を固定し得る。抗体は、毒素または画像化剤に結合され得る。

#### 【0145】

全長 M I D 4460 タンパク質または M I D 4460 の抗原性ペプチドフラグメントは、免疫原として使用され得るか、または他の免疫原（例えば、細胞、膜調製物など）を用いて作製される抗 M I D 4460 抗体を同定するために使用され得る。M I D 4460 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アミノ酸残基を含むべきであり、かつ M I D 4460 のエピトープを含むべきである。好ましくは、この抗原性ペプチドは、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。

40

#### 【0146】

配列番号2の残基約65～85、約140～175、約190～225、約230～240、約250～265、約315～350、約365～395、約402～422、約420～435、約450～470、約480～488、約495～505、約510～5

50

25、約540～558、約561～580、約595～630、約700～715、約773～790、約800～818、約835～855、約921～945、約995～1015、および1075～1118を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質の親水性領域に対する抗体を作製するために使用され得る（例えば、免疫原として使用され得るか、または抗体の特異性を特徴付けるために使用され得る）（図2を参照のこと）。同様に、配列番号2の残基約1～25、約85～100、約355～365、約710～720、約750～775または約1020～1040を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質の疎水性領域に対する抗体を作製するために使用され得；配列番号2の残基約1～754またはそのサブセット（例えば、約残基1～25、約残基28～108、約残基119～201、約残基299～381、約残基388～469、約残基477～559、約残基567～656、約残基656～754）を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質の細胞外領域に対する抗体を作製するために使用され得；配列番号2の残基約778～1118、約846～1080、約977～1080、または約821～1083を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質の細胞内領域に対する抗体を作製するために使用され得；配列番号2の残基約977～1080、約821～1083または約846～1080を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質のタンパク質-チロシンホスファターゼ領域に対する抗体を作製するために使用され得；配列番号2の残基約754～778を含む、M I D 4460のフラグメントは、M I D 4460タンパク質の膜貫通ドメインに対する抗体を作製するために使用され得る。

10

20

#### 【0147】

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

#### 【0148】

抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、タンパク質の表面に位置付けられるM I D 4460の領域（例えば、親水性領域）ならびに高い抗原性を有する領域である。例えば、ヒトM I D 4460タンパク質配列のE m i n i表面確率分析を使用して、M I D 4460タンパク質の表面に位置づけられるという特に高い確率を有し、従って、標的化抗体の生成のために有用な表面残基を構成する可能性が高い領域が示され得る。

30

#### 【0149】

好ましい実施形態において、抗体は、M I D 4460タンパク質の細胞外部分に結合し得る（例えば、抗体は、M I D 4460タンパク質を発現する細胞全体に結合し得る）。別の実施形態において、抗体は、M I D 4460タンパク質の細胞内部分に結合する。

#### 【0150】

好ましい実施形態において、抗体は、本明細書中に記載されるM I D 4460タンパク質上の任意のドメインまたは領域におけるエピトープに結合する。

#### 【0151】

さらに、キメラ抗体、ヒト化抗体、および完全ヒト抗体もまた、本発明の範囲内である。キメラ抗体、ヒト化抗体、しかし最も好ましくは、完全ヒト抗体は、反復投与を含む適用（例えば、ヒト患者の治療的処置）のために、およびいくつかの診断的適用のために所望される。

40

#### 【0152】

キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体（ヒト部分および非ヒト部分の両方を含む）は、標準的な組換えDNA技術を使用して作製され得る。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術（例えば、Robinsonら、国際出願番号PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願184,187；Taniguchi、欧州特許出願171,

50

496; Morrisonら、欧州特許出願173,494; Neubergerら、PCT国際公開番号WO86/01533; Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Cabillyら、欧州特許出願125,023; Betterら(1988) Science 240:1041-1043; Liuら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら(1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら(1987) Canc. Res. 47:999-1005; Woodら(1985) Nature 314:446-449; および Shawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559に記載の方法を使用する)によって生成され得る。 10

#### 【0153】

ヒト化抗体または相補的決定領域(CDR)移植された抗体は、ドナーCDRと置換した少なくとも1つまたは2つ(しかし、一般に3つ全て)のレシピエント(重鎖免疫グロブリン鎖および/または軽鎖免疫グロブリン鎖の)CDRを有する。抗体は、非ヒトCDRの少なくとも一部と置換され得るか、またはCDRのいくつかは、非ヒトCDRで置換され得る。MID 4460またはそのフラグメントに対するヒト化抗体の結合に必要とされるCDRの数を置換することだけが必要である。好ましくは、ドナーは、げっ歯類抗体(例えば、ラット抗体またはマウス抗体)であり、そしてレシピエントは、ヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークである。代表的に、CDRを提供する免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、そしてフレームワークを提供する免疫グロブリンは、 20「アクセプター」と呼ばれる。1つの実施形態において、ドナー免疫グロブリンは、非ヒト(例えば、げっ歯類)である。アクセプターフレームワークは、天然に存在する(例えば、ヒト)フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、あるいはこれらに約85%以上、好ましくは、90%、95%、99%以上同一である配列である。

#### 【0154】

本明細書中で使用される場合、用語「コンセンサス配列」は、あるファミリーの関連する配列において最も頻繁に生じるアミノ酸(またはヌクレオチド)から形成される配列をいう(例えば、Winnaker(1987), From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germanyを参照のこと)。あるファミリーのタンパク質において、コンセンサス配列中の各位置が、そのファミリー中のその位置で最も頻繁に存在するアミノ酸によって占められる。2つのアミノ酸が同等に頻繁に生じる場合、いずれもコンセンサス配列中に含まれ得る。「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列中のフレームワーク領域をいう。 30

#### 【0155】

抗体は、当該分野において公知の方法によってヒト化され得る。ヒト化抗体は、抗原結合に直接関与しないFv可変領域の配列をヒトFv可変領域からの等価な配列で置換することによって生成され得る。ヒト化抗体を生成するための一般的な方法は、Morrison(1985), Science 229:1202-1207、Oiら(1986), BioTechniques 4:214、ならびにQueenら米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号および同第5,693,762号(これらの全ての内容が、本明細書中に参考として援用される)によって提供される。これらの方法は、重鎖および軽鎖のうちの少なくとも1つからの免疫グロブリンFv可変領域の全てまたは一部をコードする核酸配列を単離する工程、操作する工程、および発現する工程を包含する。このような核酸の供給源は、当業者に周知であり、例えば、MID 4460ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する抗体を産生するハイブリドーマより取得され得る。次いで、ヒト化抗体をコードする組換えDNAまたはそのフラグメントは、適切な発現ベクター中にクローニングされ得る。 40

#### 【0156】

ヒト化抗体またはCDR移植された抗体は、CDR移植またはCDR置換によって産生さ 50

れ得、ここで、免疫グロブリン鎖のCDRのうち1つ、2つまたは全てが置換され得る。例えば、米国特許第5,225,539号; Jonesら(1986) Nature 321:552-525; Verhoeyanら(1988) Science 239:1534; Beidlerら(1988) J. Immunol. 141:4053-4060; Winter 米国特許第5,225,539号(これら全ての内容が本明細書中に参考として明らかに援用される)を参照のこと。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するために使用され得るCDR移植方法を記載する(1987年3月26日に出願されたUK特許出願GB2188638A; Winter 米国特許第5,225,539号(この内容は参考として明らかに援用される)。

#### 【0157】

特定のアミノ酸が置換、欠失または付加されているヒト化抗体はまた、本発明の範囲内である。好ましいヒト化抗体は、例えば、抗原に対する結合を改善するようにフレームワーク領域にアミノ酸置換を有する。例えば、ヒト化抗体は、ドナーフレームワーク残基に同一のフレームワーク残基を有するか、またはレシピエントフレームワーク残基以外の別のアミノ酸に同一のフレームワーク残基を有する。このような抗体を生成するために、ヒト化免疫グロブリン鎖の選択された少数のアクセプターフレームワーク残基は、対応するドナーアミノ酸で置換され得る。好ましい置換の位置は、CDRに隣接するアミノ酸残基またはCDRと相互作用し得るアミノ酸残基を含む(例えば、米国特許第5,585,089号を参照のこと)。ドナーからアミノ酸を選択するための基準は、米国特許第5,585,089号(例えば、米国特許第5,585,089号の12~16欄、例えば、米国特許第5,585,089号の12~16欄(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。ヒト化抗体のための他の技術は、Padlanら、EP519596 A1(1992年12月23日公開)に記載される。

#### 【0158】

完全ヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置のために特に所望される。このような抗体は、内因性免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の遺伝子を発現し得ないがヒトの重鎖および軽鎖の遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを使用して生成され得る。例えば、LomborgおよびHuszar(1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; ならびに米国特許第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,569,825号; 同第5,661,016号; および同第5,545,806号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Fremont, CA) および Medarex, Inc. (Princeton, NJ) のような企業が、上記技術と類似の技術を使用して、選択された抗原に対して指向されたヒト抗体の提供に従事し得る。

#### 【0159】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「ガイド化選択(guided selection)」と呼ばれる技術を使用して生成され得る。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス抗体)を、同一のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択をガイドするために使用する。この技術は、Jespersら(1994) Bio/Technology 12:899-903に記載される。

#### 【0160】

抗MID 4460抗体は、単鎖抗体であり得る。単鎖抗体(scFv)は、例えば、Colcherら(1999) Ann. N. Y. Acad. Sci. 880:263-80; および Reiter(1996) Clin. Cancer Res. 2:245-52に記載されるようにして、操作され得る。単鎖抗体は、同一の標的MID 4460タンパク質の異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を生成するために二量体化されても多量体化されてもよい。

#### 【0161】

好ましい実施形態において、抗体は、Fcレセプターに結合する能力を低減されているかまたは全く有さない。例えば、抗体は、Fcレセプターに対する結合を支持しないアイソタイプまたはサブタイプ、フラグメントまたは他の変異体である。例えば、抗体は、変異

10

20

30

40

50

または欠失されたFcレセプター結合領域を有する。

【0162】

抗体（またはそのフラグメント）は、細胞毒、治療剤または放射活性イオンのような治療的部分に結合体化され得る。細胞毒または細胞傷害剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。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、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、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オン、メトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、マイタンシノイド（maytansinoid）（例えば、マイタンシノール（maytansinol）（例えば、米国特許第5,208,020号を参照のこと）、CC-1065（米国特許第5,475,092号、同第5,585,499号、同第5,846,545号を参照のこと）およびそれらのアナログまたはホモログ）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-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）クロラムブシル、CC-1065、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）、プスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（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（以前の名称は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前の名称は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））および抗有糸分裂薬（例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、タキソール、およびマイタンシノイド）が挙げられるが、これらに限定されない。放射活性イオンとしては、ヨウ素、イットリウム、およびプラセオジミウムが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0163】

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、治療的部分は、伝統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、治療的部分は、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。このようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス体外毒素またはジフテリア毒素）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経発育因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子）；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」）または他の増殖因子）など、が挙げられ得る。

30

【0164】

あるいは、抗体は二次抗体と結合体化されて、Segal、米国特許第4,676,980号に記載のような抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

40

【0165】

抗MID 4460抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、標準的技術（例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降）によってMID 4460を単離し得る。さらに、抗MID 4460抗体を使用して、このタンパク質発現の多さおよびパターンを評価するために、（例えば、細胞溶解物または細胞上清において）MID 4460タンパク質を検出し得る。抗MID 4460抗体を診断的に使用して、臨床試験手順の一部として（例えば、所定の処置レジメンの効率を決定するために）組織中のタンパク質レベルをモニタリングし得る。検出は、抗体を検出可能な物質に結合（すなわち、生理学的結合）すること（すなわち、抗体標識）によって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および

50

放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオロセイン、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオロセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして適切な放射活性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ または $^3\text{H}$ が挙げられる。

#### 【0166】

好ましい実施形態において、抗体は、精製されたM I D 4460抗原、またはそのフラグメント（例えば、本明細書中に記載されるフラグメント）、膜結合抗原、組織（例えば、粗製組織調製物）、細胞全体（好ましくは、生きている細胞）、溶解された細胞、または細胞画分（例えば、膜画分）を用いて免疫することによって作製され得る。

#### 【0167】

ネイティブのM I D 4460タンパク質にのみ結合する抗体、変性されたM I D 4460タンパク質もしくは他の非ネイティブM I D 4460タンパク質にのみ結合する抗体、または両方に結合する抗体が、本発明の範囲内にある。直鎖状エピトープまたは立体配置エピトープとの抗体が、本発明の範囲内にある。立体配置エピトープは時として、ネイティブのM I D 4460タンパク質に結合するが変性されたM I D 4460タンパク質には結合しない抗体を同定することによって同定され得る。

#### 【0168】

（組換え発現ベクター、宿主細胞および遺伝子操作された細胞）

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

#### 【0169】

ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適切な形態でM I D 4460核酸を含み得る。好ましくは、組換え発現ベクターは、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列を含む。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現、ならびに組織特異的調節および/または誘導性配列を指向する配列を含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得る。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、これにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはポリペプチド（融合タンパク質またはポリペプチドを含む）（例えば、M I D 4460タンパク質、M I D 4460タンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を産生し得る。

#### 【0170】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞におけるM I D 4460タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、E. coli、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現ベクターを使用して）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、さらにGoeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CAに議論される。あるいは、組換え発現ベクターは、（例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して）インビトロで転写および翻訳され得る。

10

20

30

40

50

## 【0171】

原核生物におけるタンパク質発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを用いて、ほとんど *E. coli* にて行われる。融合ベクターは、多くのアミノ酸をその融合ベクター内でコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。このような融合ベクターは、代表的に以下の3つの目的で働く：1) 組換えタンパク質の発現を増加させるため；2) 組換えタンパク質の安定性を増加させるため；および3) アフィニティ精製におけるリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製における補助のため。しばしば、タンパク質分解性切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との連結部に導入され、そして組換えタンパク質の融合部分からの分離、続く融合タンパク質の精製を可能にする。このような酵素およびこれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; SmithおよびJohnson (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) および pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) (これらはそれぞれ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質に融合する) が挙げられる。

10

## 【0172】

精製された融合タンパク質は、MID 4460 活性アッセイ (例えば、以下に詳細に記載される直接アッセイまたは競合アッセイ) において、またはMID 4460 タンパク質に特異的または選択的な抗体を生成するために使用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される融合タンパク質を使用して、骨髄細胞を感染し続いて照射したレシピエントに移植し得る。次いで、被験体レシピエントの病理学は、十分な時間が経過した後 (例えば、6週間) に試験される。

20

## 【0173】

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

30

## 【0174】

MID 4460 発現ベクターは、酵母発現ベクター、昆虫細胞内での発現のためのベクター (例えば、バキュロウイルス発現ベクター) または哺乳動物細胞内での発現に適切なベクターであり得る。

## 【0175】

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、ウイルス調節エレメントによってしばしば提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルスおよびシミアンウイルス40由来である。

40

## 【0176】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指向し得る (例えば、組織特異的調節エレメントが核酸の発現に使用される)。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkertら (1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンパ特異的プロモーター (CalameおよびEaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、T細胞レセプターの特異的プロモーター (Win

50

ottoおよびBaltimore(1989)EMBO J. 8:729-733)、および免疫グロブリン(Banerjiら(1983)Cell 33:729-740; QueenおよびBaltimore(1983)Cell 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、ニューロフィラメントプロモーター; ByrneおよびRuddle(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlundら(1985)Science 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清ホエープロモーター; 米国特許第4,873,316号および欧州特許出願公開番号264,166号)が挙げられる。発生的に調節されるプロモーター(例えば、マウスhoxプロモーター(KesselおよびGruss(1990)Science 249:374-379)および - フェトプロテインプロモーター(CampesおよびTilghman(1989)Genes Dev. 3:537-546))がまた、含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0177】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。種々の細胞型のアンチセンスRNAの、構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指示する、アンチセンスの向きでクローニングされた核酸に対して作動可能に連結された調節配列(例えば、ウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサー)が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節に関する概説については、Weintraubら(1986)Reviews-Trends in Genetics 1:1を参照のこと。

#### 【0178】

本発明の別の局面は、本明細書中に記載された核酸分子(例えば、組換え発現ベクター内のMID 4460核酸分子、またはMID 4460核酸分子が宿主細胞ゲノムの特定の部位中に相同的に組換えることを可能とする配列を含むMID 4460核酸分子)を含有する宿主細胞を提供する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の被験細胞をいうのみならず、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をもいう。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際の細胞と同一でなくてもよいが、なお、本明細書中で使用されるようなこの用語の範囲内に含まれる。

#### 【0179】

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、MID 4460タンパク質は、細菌細胞(例えば、E. coli)、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞またはCV-1起源、SV-40(COS)細胞)で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

#### 【0180】

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

#### 【0181】

本発明の宿主細胞を使用して、MID 4460タンパク質を生成(すなわち、発現)し得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用してMID 4460タンパク質を生成するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、MID 4460タンパク質が生成されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞(この中に、MID 4460タンパク質をコードする組換え発現ベクターが導入されている)を培養す



る工程を、包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞から M I D 4 4 6 0 タンパク質を単離する工程を、包含する。

【0182】

別の局面において、本発明は、細胞、または M I D 4 4 6 0 トランスジーンを含有する細胞もしくはそれ以外に M I D 4 4 6 0 を誤発現する ( m i s e x p r e s s ) 細胞からの精製調製物を特徴とする。この細胞調製物は、ヒト細胞または非ヒト細胞 (例えば、げっ歯類細胞 (例えば、マウス細胞もしくはラット細胞)、ウサギ細胞、またはブタ細胞) からなり得る。好ましい実施形態において、細胞は M I D 4 4 6 0 トランスジーン (例えば、M I D 4 4 6 0 の異種形態、例えば、(非ヒト細胞の場合の) ヒト由来の遺伝子) を、含有する。この M I D 4 4 6 0 トランスジーンは、誤って発現 (例えば、過剰発現または寡少発現 ( u n d e r e x p r e s s ) ) され得る。別の好ましい実施形態において、細胞は、内在性 M I D 4 4 6 0 を誤って発現する遺伝子 (例えば、遺伝子発現が損なわれる遺伝子 (例えば、ノックアウト)) を含有し得る。このような細胞は、変異した M I D 4 4 6 0 対立遺伝子、または誤って発現された M I D 4 4 6 0 対立遺伝子に関係する障害を研究するためのモデル、または薬物スクリーニングにおける使用のためのモデルとして使用され得る。

10

【0183】

別の局面において、本発明は、本発明の M I D 4 4 6 0 ポリペプチドをコードする核酸で形質転換されたヒト細胞 (例えば、血球幹細胞) を、特徴とする。

【0184】

また、細胞、好ましくはヒト細胞 (例えば、ヒト血球系細胞または線維芽細胞) が提供され、この細胞中では、内因性 M I D 4 4 6 0 が、正常では内因性 M I D 4 4 6 0 遺伝子の発現を制御しない調節配列の制御下にある。細胞 (例えば、細胞株または微生物) 中の内因性遺伝子の発現特徴は、挿入された調節エレメントが内因性 M I D 4 4 6 0 遺伝子に作動可能に連結されるように、細胞のゲノム中に異種性の D N A 調節エレメントを挿入することによって改変され得る。例えば、「転写的にサイレント」 (例えば、正常では発現されない) であるか、または極低レベルでのみ発現される内因性 M I D 4 4 6 0 遺伝子を、その細胞中で正常に発現される遺伝子産物の発現を促進し得る調節性エレメントを挿入することによって、活性化し得る。標的化相同組換えのような技術を使用して、例えば、1991年5月16日に発行された C h a p p e l、米国特許第 5, 272, 071 号; W O 91/06667 に記載されるように、異種性 D N A を挿入し得る。

20

30

【0185】

(トランスジェニック動物)

本発明は、非ヒトトランスジェニック動物を提供する。このような動物は、M I D 4 4 6 0 タンパク質の機能および/または活性を研究するため、ならびに M I D 4 4 6 0 の活性の調節因子を同定および/または評価するために、有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」は、その動物の細胞の1つ以上がトランスジーンを含有する、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットもしくはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。トランスジーンとは、好ましくは、トランスジェニック動物の細胞のゲノム中に組み込まれるか、またはゲノム中に生じる、外因性 D N A または再配置 (例えば、内因性染色体 D N A の欠失) である。トランスジーンは、トランスジェニック動物の1つ以上の細胞型もしくは組織においてコードされる遺伝子産物の発現を指令し得、他のトランスジーン (例えば、ノックアウト) は、発現を減少させる。従って、トランスジェニック動物は、内因性 M I D 4 4 6 0 遺伝子が、例えば、内因性遺伝子と、その動物の発生前にその動物の細胞 (例えば、動物の胚細胞) 中に導入された外因性 D N A との間の相同組換えによって、変更された動物であり得る。

40

【0186】

イントロン配列およびポリアデニル化シグナルはまた、トランスジーンの前発現の効率を増

50

加させるためにトランスジーン中に含まれ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対してM I D 4 4 6 0タンパク質の発現を指向するために、本発明のトランスジーンに作動可能に連結され得る。トランスジェニック創始動物は、そのゲノムにおけるM I D 4 4 6 0トランスジーンが存在および/またはこの動物の組織もしくは細胞におけるM I D 4 4 6 0 m R N Aの発現に基づいて、同定され得る。次いで、トランスジェニック創始動物を使用して、トランスジーンを保有するさらなる動物を育種し得る。さらにM I D 4 4 6 0タンパク質をコードするトランスジーンを保有するトランスジェニック動物は、さらに、他のトランスジーンを有する他のトランスジェニック動物と交配され得る。

【0187】

M I D 4 4 6 0タンパク質またはM I D 4 4 6 0ポリペプチドは、トランスジェニック動物またはトランスジェニック植物において発現され得る（例えば、このタンパク質またはペプチドをコードする核酸が、動物のゲノム中に導入され得る）。好ましい実施形態において、この核酸を、組織特異的なプロモーター（例えば、母乳特異的プロモーターまたは卵特異的プロモーター）の制御下に配置し、そして動物により産生される母乳または卵から回収される。適切な動物は、マウス、ブタ、ウシ、ヤギおよびヒツジである。

10

【0188】

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

【0189】

（用途）

20

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

【0190】

本発明の単離された核酸分子を使用して、例えば、M I D 4 4 6 0タンパク質を（例えば、遺伝子治療の適用における、宿主細胞中の組換え発現ベクターを介して）発現し得、（例えば、生物学的サンプル中の）M I D 4 4 6 0 m R N Aを検出し得、またはM I D 4 4 6 0遺伝子中の遺伝子の変更を検出し得、そして以下にさらに記載されるように、M I D 4 4 6 0の活性を調節し得る。M I D 4 4 6 0タンパク質を使用して、M I D 4 4 6 0基質またはM I D 4 4 6 0インヒビターの不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害を処置し得る。さらに、M I D 4 4 6 0タンパク質を使用して、天然に存在するM I D 4 4 6 0の基質についてスクリーニングし得、M I D 4 4 6 0活性を調節する薬物または化合物をスクリーニングし得、ならびにM I D 4 4 6 0野生型タンパク質と比較して、減少した活性、異常な活性または所望されない活性（例えば、異常なまたは欠損性のホスファターゼの機能または発現）を有する、M I D 4 4 6 0タンパク質またはM I D 4 4 6 0タンパク質形態の生成物の不十分な生成または過剰な生成によって特徴付けられる障害（例えば、肺癌、結腸癌および乳癌を含む、細胞増殖、細胞分化障害）を、処置し得る。さらに、本発明の抗M I D 4 4 6 0抗体を使用して、M I D 4 4 6 0タンパク質を検出および単離し得、M I D 4 4 6 0タンパク質の生物利用能を調節し得、そしてM I D 4 4 6 0活性を調節し得る。

30

40

【0191】

本発明のM I D 4 4 6 0ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）能力について化合物を評価する方法を提供する。この方法は、以下を包含する：本発明のM I D 4 4 6 0ポリペプチドと化合物とを接触させる工程；および化合物がこの本発明のM I D 4 4 6 0ポリペプチドと相互作用する（例えば、結合する）か、または複合体を形成する能力を評価する工程。この方法は、インビトロ（例えば、無細胞系）でか、またはインビボ（ツーハイブリッド相互作用トラップアッセイ）で実施され得る。この方法を使用して、本発明のM I D 4 4 6 0ポリペプチドと相互作用する、天然に存在する分子を同定し得る。またこの方法を使用して、本発明のM I D 4 4 6 0ポリペプチドの天然インヒビ

50

ターまたは合成インヒビターを見出し得る。スクリーニング方法を、以下により詳細に考察する。

【0192】

(スクリーニングアッセイ)

本発明は、M I D 4460タンパク質に結合するか、例えばM I D 4460発現もしくはM I D 4460活性に対する刺激作用もしくは阻害作用を有するか、または例えばM I D 4460基質の発現または活性に対する刺激作用または阻害作用を有する、モジュレーター、すなわち候補または試験の化合物または因子(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、低分子または他の薬物)を同定するための方法(本明細書中でスクリーニングアッセイともいわれる)を提供する。このように、同定された化合物を使用して、治療プロトコル中で標的遺伝子産物(例えば、M I D 4460遺伝子)の活性を調節し得るか、標的遺伝子産物の生物学的機能を調節し得るか、または正常な標的遺伝子の相互作用を無効化(disrupt)する化合物を、同定し得る。

10

【0193】

1つの実施形態において、本発明は、M I D 4460タンパク質もしくはM I D 4460ポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分の基質である、候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の実施形態において、本発明は、M I D 4460タンパク質もしくはM I D 4460ポリペプチド、またはその生物学的に活性な部分の活性に結合するかまたはその活性を調節する、候補化合物または試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

20

【0194】

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

30

【0195】

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

40

【0196】

化合物のライブラリーは、溶液中に存在し得るか(例えば、Houghten(1992)Biotechniques 13: 412~421)、ピース上(Lam(1991)Nature 354: 82~84)、チップ上(Fodor(1993)Nature 364: 555~556)、細菌上(Ladner、米国特許第5,223,409号)、胞子上(Ladner、米国特許'409号)、プラスミド上(Cullら(19

50

92) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865~1869) またはファージ上 (Scott および Smith (1990) Science 249:386~390; Devlin (1990) Science 249:404~406; Cwirlla ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6387~6382; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301~310; Ladner 前出) であり得る。

#### 【0197】

1つの実施形態では、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、ここで MID 4460 タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を、試験化合物と接触させ、そして試験化合物が MID 4460 活性を調節する能力を決定する。試験化合物が MID 4460 活性を調節する能力の決定を、例えば、MID 4460 基質のリン酸エステル加水分解をモニターすることによって成し得る。例えばこの細胞は、哺乳動物由来 (例えば、ヒト) であり得る。

#### 【0198】

試験化合物が化合物 (例えば、MID 4460 基質) に結合する MID 4460 を調節する能力、または MID 4460 に結合する能力をまた、評価し得る。このことは、例えば、化合物 (例えば、基質) を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得、その結果、複合体中の標識された化合物 (例えば、基質) を検出することによって、化合物 (例えば、基質) の MID 4460 への結合を決定し得る。あるいは、MID 4460 を放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、複合体中で試験化合物が MID 4460 基質に結合する MID 4460 を調節する能力をモニタリングし得る。例えば、化合物 (例えば、MID 4460 基質) を、<sup>125</sup>I、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S、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し得、そしてこの放射性同位体が、放射線放射の直接的な計数によってか、またはシンチレーション計数によってか検出され得る。あるいは、化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そして適切な基質の産物への変換を定量することによって、この酵素標識を検出し得る。

#### 【0199】

化合物 (例えば、MID 4460 基質) が、任意の相互作用体 (interactant) の標識化を有する MID 4460 またはこれを有さない MID 4460 と相互作用する能力を、評価し得る。例えば、微小生理機能測定器 (microphysiometer) を使用して、化合物または MID 4460 のいずれかの、標識化を有さない MID 4460 との化合物の相互作用を測定し得る。McConnell ら (1992) Science 257:1906-1912。本明細書中で使用される場合、「微小生理機能測定器」 (例えば、Cytosensor) は、光でアドレス可能な電位差測定センサー (LAPS) を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する、分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と MID 4460 との間の相互作用の指標として使用され得る。

#### 【0200】

なお別の実施形態において、MID 4460 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 MID 4460 タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力を評価する、無細胞アッセイを提供する。本発明のアッセイに使用するための MID 4460 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 MID 4460 分子と相互作用する役割を持つフラグメント (例えば、高い表面存在可能性スコアを有するフラグメント) が挙げられる。

#### 【0201】

本発明の無細胞アッセイにおいて、単離したタンパク質 (例えば、MID 4460 タンパク質またはその生物学的に活性な部分) の可溶性形態および/または膜結合形態を、使用し得る。膜結合形態のタンパク質を使用する場合、可溶化剤を利用することが望ましい。このような可溶化剤の例としては、以下のような非イオン性界面活性剤が挙げられる：

n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、オクタノイル - N - メチルグルカミド、デカノイル - N - メチルグルカミド、Triton (登録商標) X - 100、Triton (登録商標) X - 114、Thesit (登録商標)、イソトリデシルポリ (エチレングリコールエーテル)<sub>n</sub> (Isotridecylpoly (ethylene glycol ether)<sub>n</sub>)、3 - [ (3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ ] - 1 - プロパンスルホネート (3 - [ (3 - cholamidopropyl) dimethylamminio ] - 1 - propane sulfonate) (CHAPS)、3 - [ (3 - コラミドプロピル) ジメチルアンモニオ ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート (3 - [ (3 - cholamidopropyl) dimethylamminio ] - 2 - hydroxy - 1 - propane sulfonate) (CHAPSO)、または N - ドデシル = N, N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート。

10

#### 【0202】

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

#### 【0203】

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

20

30

#### 【0204】

別の実施形態において、MID 4460タンパク質が標的分子に結合する能力の決定を、リアルタイムの生体分子相互作用分析 (Biomolecular Interaction Analysis) (BIA) を使用して達成し得る (例えば、SjolanderおよびUrbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338~2345、ならびにSzaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699~705を参照のこと)。「表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance)」または「BIA」は、いずれの相互作用物 (例えば、BIACore) も標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を検出する。結合表面の質量の変化 (結合事象を表す) は、表面付近の光の屈折率の変化 (表面プラズモン共鳴の光学的現象 (optical phenomenon) (SPR)) を生じ、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る、検出可能なシグナルを生じる。

40

#### 【0205】

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

#### 【0206】

50

M I D 4 4 6 0、抗 M I D 4 4 6 0 抗体またはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を容易にし、そしてこのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の M I D 4 4 6 0 タンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での M I D 4 4 6 0 タンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するのに適切な任意の容器内で成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方をマトリックスに結合することを可能にするドメインを追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/M I D 4 4 6 0 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の標的タンパク質または M I D 4 4 6 0 タンパク質のいずれかと混ぜ合わせ、そしてこの混合物を、複合体形成に貢献する条件下 (例えば、塩および pH に関して生理学的条件) でインキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、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 M I D 4 4 6 0 結合レベルまたは M I D 4 4 6 0 活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。

10

20

**【0207】**

M I D 4 4 6 0 タンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上に固定するための他の技術としては、ビオチンとストレプトアビジンとの複合体化を使用することが挙げられる。ビオチン化された M I D 4 4 6 0 タンパク質または標的分子を、当該分野において公知の技術を使用して、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ジンでコーティングした 96 ウェルのプレート (Pierce Chemical) のウェル中に固定し得る。

**【0208】**

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

30

**【0209】**

1つの実施形態において、M I D 4 4 6 0 タンパク質または標的分子と反応性であるが、M I D 4 4 6 0 タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体を利用して、アッセイを実施する。このような抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的または M I D 4 4 6 0 タンパク質が、抗体の複合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST 固定化複合体に関しての上記のものに加えて、M I D 4 4 6 0 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 M I D 4 4 6 0 タンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

40

**【0210】**

あるいは、無細胞アッセイを液相中で行い得る。このようなアッセイにおいて、以下に挙げられる任意の多くの標準的な技術によって、反応生成物を未反応成分から分離するが、

50

これらに限定されない：差次的遠心分離（例えば、RivasおよびMinton（1993）Trends Biochem Sci 18:284-7を参照のこと）；クロマトグラフィー（ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー）；電気泳動（例えば、Ausubelら編（1999）、Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: New York.を参照のこと）；および免疫沈降（例えば、Ausubelら、編（1999）Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley, New Yorkを参照のこと）。このような樹脂およびクロマトグラフィー技術は当業者に公知である（例えば、Heegaard（1998）J Mol Recognit 11:141-8；Hage, およびTweed（1997）J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 699:499-525を参照のこと）。さらに、蛍光エネルギー転移をまた、本明細書中に記載されるように、うまく使用して、溶液からの複合体のさらなる精製なしに結合を検出し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0211】

好ましい実施形態において、このアッセイは、MID 4460タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、MID 4460を結合する公知化合物と接触させてアッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物がMID 4460タンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、試験化合物がMID 4460タンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、公知化合物と比較した場合、試験化合物が、好ましくMID 4460タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力、または標的分子の活性を調節する能力を決定する工程を包含する。

#### 【0212】

本発明の標的遺伝子産物は、インピボで、1つ以上の細胞性高分子または細胞外高分子（例えば、タンパク質）と相互作用し得る。この考察の目的のために、このような細胞性高分子および細胞外高分子は、本明細書中で、「結合パートナー」といわれる。このような相互作用を無効化する化合物は、標的遺伝子産物の活性を調節するのに有用であり得る。このような化合物としては、抗体、ペプチドおよび低分子のような分子が挙げられ得るが、これらに限定されない。この実施形態における使用のための好ましい標的遺伝子/生成物は、本明細書中で同定されたMID 4460遺伝子である。代替の実施形態において、本発明は、試験化合物が、MID 4460標的分子の下流のエフェクターの活性の調節を介して、MID 4460タンパク質の活性を調節する能力を決定するための方法を提供する。例えば、これまでに記載されたように、適切な標的に対するエフェクター分子の活性を決定し得るか、またはエフェクターの適切な標的に対する結合を決定し得る。

#### 【0213】

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

重要であり得る。

【0214】

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

10

【0215】

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

【0216】

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

20

【0217】

あるいは、この反応は、試験化合物の存在下または非存在下で液体層で実行され得、反応産物は、未反応成分から分離され、そして複合体が検出される；例えば、溶液中で形成される任意の複合体を固定させる結合成分の1つに特異的または選択的な固定化抗体、および固定された複合体を検出する他のパートナーに特異的または選択的な標識化抗体を用いて。再度、液相への反応物の添加の順番に依存して、複合体を阻害するか、または予め形成された複合体を破壊する試験化合物が、同定され得る。

30

【0218】

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

40

【0219】

なお別の局面において、M I D 4460タンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第5,283,317号；Z e r v o

50



sら、(1993) Cell 72: 223 ~ 232; Maduraら(1993) J. Biol. Chem. 268: 12046 ~ 12054; Bartelら(1993) Bio techniques 14: 920 ~ 924; Iwabuchiら(1993) Oncogene 8: 1693 - 1696; および Brent WO 94 / 10300を参照のこと)において「ベイト(bait)タンパク質」として使用されて、MID 4460(「MID 4460 - 結合タンパク質」または「MID 4460 - bp」と結合または相互作用し、そしてMID 4460活性に関する他のタンパク質を同定し得る。このようなMID 4460 - bpは、例えば、MID 4460媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、MID 4460タンパク質またはMID 4460標的によるシグナルのアクティベーターまたはインヒビターであり得る。

10

#### 【0220】

ツーハイブリッドシステムは、大半の転写因子のモジュラー性質に基づき、これは別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。手短には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、MID 4460タンパク質をコードする遺伝子は、公知の転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他の構築物において、同定されていないタンパク質(「プレイ(pre y)」または「サンプル」)をコードするDNA配列のライブラリー由来のDNA配列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。(あるいは:MID 4460タンパク質は、アクチベータードメインに融合され得る)。「ベイト」タンパク質および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用してMID 4460依存性複合体を形成し得る場合、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、密接に近くにされる。このように近くにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結したレポーター遺伝子(例えば、lacZ)の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現は検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そしてMID 4460タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得るために使用され得る。

20

#### 【0221】

別の実施形態において、MID 4460発現のモジュレーターが、同定される。例えば、細胞または細胞を含有しない混合物は、候補化合物と接触させられ、そしてMID 4460 mRNAまたはタンパク質の発現は、候補化合物の非存在下でMID 4460 mRNAまたはタンパク質の発現のレベルに相関して上昇した。MID 4460 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下で大きい場合、候補化合物は、MID 4460 mRNAまたはタンパク質発現の刺激因子として同定される。あるいは、MID 4460 mRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下よりもその存在下でより少ない(統計学的に有意に少ない)場合、候補化合物は、MID 4460 mRNAまたはタンパク質発現のインヒビターとして同定される。MID 4460 mRNAまたはタンパク質発現のレベルが、MID 4460 mRNAまたはタンパク質の検出について本明細書中に記載される方法によって決定され得る。

30

#### 【0222】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そしてMID 4460タンパク質の活性を調節する因子の能力は、例えば、動物において(例えば、異常なもしくは欠損性のホスファターゼの機能もしくは発現、または心臓血管疾患についての動物モデルのような動物において)インビボで確認され得る。

40

#### 【0223】

本発明は、さらに上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤に関する。従って、このような薬剤での処置の効果、毒性、副作用、または作用機構を決定するための適切な動物モデルにおいて、本明細書中に記載されるように同定された薬剤(例えば、MID 4460調節剤、アンチセンスMID 4460核酸分子、MID 4460特異的抗体、またはMID 4460結合パートナー)をさらに使用することは本発明の範

50

囲内である。さらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤は、本明細書中で記載される処置のために使用され得る。

【0224】

(検出アッセイ)

本明細書中で同定された核酸配列の一部またはフラグメントは、ポリヌクレオチド試薬として使用され得る。例えば、これらの配列は、以下のために使用され得る：(i)染色体上のその各々の遺伝子をマップするため(例えば、遺伝性疾患に関連する遺伝子領域を位置決めするため、またはMID 4460と疾患を関係付けるため)；(ii)わずかな生物学的サンプルからの個体を同定するため(組織タイピング)；および(iii)生物学的サンプルの法医学的同定における補助。これらの適用は、以下の小節に記載される。

10

【0225】

(染色体マッピング)

MID 4460ヌクレオチド配列またはその一部は、MID 4460遺伝子の位置を染色体上にマッピングするために使用され得る。このプロセスは、染色体マッピングといわれる。染色体マッピングは、疾患と関連する遺伝子とMID 4460配列との相関において有用である。

【0226】

手短には、MID 4460遺伝子は、MID 4460ヌクレオチド配列からPCRプライマー(好ましくは15~25bp長)を調製することによって染色体にマッピングされ得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングについて有用であり得る。MID 4460配列に対応するヒト遺伝子を含むこれらのハイブリッドのみが、増幅したフラグメントを産生する。

20

【0227】

各細胞株が、単一のヒト染色体、または少数のヒト染色体のいずれか、および完全なセットのマウス染色体を含む、体細胞ハイブリッドのパネルは、特定のヒト染色体に対する個々の遺伝子の容易なマッピングを可能にし得る(D'Eustachioら(1983) Science 220:919-924)。

【0228】

他のマッピングストラテジー(例えば、インサイチュハイブリダイゼーション(Fanら(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6223-27に記載される)、標識化フローソート染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーに対するハイブリダイゼーションによる事前選択)は、染色体の位置に対するMID 4460のマッピングのために使用され得る。

30

【0229】

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

40

【0230】

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

50

## 【0231】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理学的位置は、遺伝子マップデータと相関され得る（このようなデータは、例えば、McKusick, Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを介してオンラインで利用可能）に見出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係は、例えば、Egelandら(1987) Nature, 325: 783-787に記載される、連鎖分析（物理学的に隣接した遺伝子の共同遺伝(c o - i n h e r i t a n c e)）によって同定され得る。

## 【0232】

さらに、MID 4460遺伝子に関する疾患に罹患した個体と罹患していない個体との間のDNA配列における相違が、決定され得る。変異が、いくつかまたは全ての罹患した患者において見出されるが、罹患していない患者では見出されない場合、変異は、特定の疾患の原因因子であるようである。罹患した個体および罹患していない個体の比較は、最初に一般に、染色体における構造的改変（例えば、染色体拡散から観察可能であるか、またはそのDNA配列に基づくPCRを用いて検出可能である欠失または転座）を探すことを含む。最終的に、いくらかの個体由来の遺伝子の完全な配列決定は、変異の存在を確認するため、および多型から変異を区別するために実行され得る。

## 【0233】

（組織タイピング）

MID 4460配列は、例えば、制限酵素断片長多型(RFLP)を用いて生物学的サンプルから個体を同定するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、フラグメントは分離され（例えば、サザンブロットにて）、そしてプローブされて同定のためのバンドを産生する。本発明の配列は、RFLPのためのさらなるDNAマーカーとして有用である（米国特許第5,272,057号に記載される）。

## 【0234】

さらに、本発明の配列はまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の1塩基ずつのDNA配列を決定するために使用され得る。従って、本明細書中に記載されるMID 4460ヌクレオチド配列は、その配列の5'末端および3'末端から2つのPCRプライマーを調製するために使用され得る。次いで、これらのプライマーは、個体のDNAを増幅し、次いでその配列を決定するために使用され得る。この様式で調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、特有の個体識別子を提供し得る。なぜならば、それぞれの個体は、対立遺伝子の差異に起因してこのようなDNA配列の特有のセットを有するからである。

## 【0235】

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

## 【0236】

本明細書中に記載されるMID 4460ヌクレオチド配列由来の試薬のパネルが、個体について特有の識別データベースを作成するために使用される場合、これらの同様の試薬が、個体から組織を同定するために後に使用され得る。特有の識別データベースを用いると、生きていても、死んでいても、個体のポジティブな同定は、非常に小さい組織サン

10

20

30

40

50

ルからなされ得る。

【0237】

(法医学的生物学における部分的MID 4460配列の使用)

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

【0238】

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

【0239】

本明細書中に記載されるMID 4460ヌクレオチド配列は、ポリヌクレオチド試薬(例えば、特定の組織を同定するために例えば、インサイチュハイブリダイゼーション技術で使用され得る標識化プローブまたは標識可能プローブ)を提供するためにさらに使用され得る。これは、法医学者が、未知の起源の組織が提示される場合において非常に有用であり得る。このようなMID 4460プローブのパネルは、種および/または器官型によって組織を同定するために使用され得る。

【0240】

類似の様式において、これらの試薬(例えば、MID 4460プライマーまたはプローブ)は、汚染について組織培養をスクリーニングするために使用され得る(すなわち、培養物中の異なる型の細胞の混合物の存在についてのスクリーニング)。

【0241】

(予測医学)

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

【0242】

一般に、本発明は、被験体が、病巣に関連する障害についての危険性があるか、またはMID 4460をコードする遺伝子の誤発現か否かを決定する方法を提供する。

【0243】

このような障害としては、例えば、MID 4460遺伝子の誤発現に関する障害; 肝臓の障害または心臓血管系の障害が挙げられる。

【0244】

この方法は、以下の1つ以上を包含する:

被験体の組織において、MID 4460遺伝子の発現に影響する変異の存在または非存在を検出する工程、または遺伝子の発現を制御する領域における変異(例えば、5'制御領域における変異)の存在または非存在を検出する工程;

被験体の組織において、MID 4460遺伝子の構造を改変する変異の存在または非存在を検出する工程;

被験体の組織において、mRNAレベルでMID 4460遺伝子の誤発現を検出する工程(例えば、非野生型のmRNAレベルを検出する工程);

被験体の組織において、タンパク質レベルで遺伝子の誤発現を検出する工程(例えば、非野生型のMID 4460ポリペプチドレベルを検出する工程)

好ましい実施形態において、この方法は、以下の少なくとも1つの存在を確認する工程を

10

20

30

40

50

包含する：M I D 4 4 6 0 遺伝子由来の1つ以上のヌクレオチドの欠失；遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの挿入、点変異（例えば、遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、遺伝子の全体の染色体再配列（例えば、転座、逆位、または欠失）。

【0245】

例えば、遺伝的病巣を検出するための工程としては、以下が挙げられる：(i) 配列番号1由来のセンス配列もしくはアンチセンス配列または天然に存在するその変異体、またはM I D 4 4 6 0 遺伝子と天然に会合する5'もしくは3'の隣接配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含むオリゴヌクレオチドを含むプローブ/プライマー、を提供する工程；(ii) プローブ/プライマーを、組織の核酸に曝露する工程；ならびに核酸に対するプローブ/プライマーのハイブリダイゼーション（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション）によって、遺伝的病巣の存在または非存在を検出する工程。

10

【0246】

好ましい実施形態において、誤発現を検出する工程は、以下の少なくとも1つの存在を確認する工程を包含する：M I D 4 4 6 0 遺伝子のメッセンジャーRNA転写のレベルにおける改変；遺伝子のメッセンジャーRNA転写の非野生型スプライシングパターンの存在；または非野生型のM I D 4 4 6 0 レベル。

【0247】

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

【0248】

20

好ましい実施形態において、本方法は、M I D 4 4 6 0 遺伝子の構造、障害の危険性について指標である異常な構造を決定する工程を包含する。

【0249】

好ましい実施形態において、本方法は、被験体由来のサンプルを、M I D 4 4 6 0 タンパク質に対する抗体またはその遺伝子と特異的にハイブリダイズする核酸と接触させる工程を包含する。これらおよび他の実施形態は以下に考察される。

【0250】

(診断および予後アッセイ)

生物学的サンプル中のM I D 4 4 6 0 タンパク質または核酸の存在、レベル、または非存在は、試験被験体から生物学的サンプルを得ることおよび生物学的サンプル中でM I D 4 4 6 0 タンパク質または核酸の存在が検出されるように、その生物学的サンプルをM I D 4 4 6 0 タンパク質またはM I D 4 4 6 0 タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムRNA）を検出し得る化合物または薬剤と接触させることによって評価され得る。用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および流体を含む。好ましい生物学的サンプルは、血清である。M I D 4 4 6 0 遺伝子の発現のレベルは、多くの方法で測定され得、この方法として以下が挙げられるがこれらに限定されない：M I D 4 4 6 0 遺伝子にコードされるmRNAを測定する方法；M I D 4 4 6 0 遺伝子にコードされるタンパク質の量を測定する方法；またはM I D 4 4 6 0 遺伝子にコードされるタンパク質の活性を測定する方法。

40

【0251】

M I D 4 4 6 0 遺伝子に対応する細胞内のmRNAのレベルは、インサイチュ形式およびインビトロ形式の両方によって決定され得る。

【0252】

単離されたmRNAは、ハイブリダイゼーションアッセイあるいは増幅アッセイ（サザン解析またはノザン解析、ポリメラーゼ連鎖反応解析およびプローブアレイを含むがこれらに限定されない）において使用され得る。mRNAレベルの検出のための一つの好ましい診断方法は、単離されたmRNAを、検出される遺伝子によってコードされるmRNAにハイブリダイズし得る核酸分子（プローブ）と接触させる工程を包含する。核酸プローブは、例えば、全長のM I D 4 4 6 0 核酸（例えば、配列番号1の核酸）、またはその部

50

分（例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さであり、そしてストリンジェント条件下でMID 4460 mRNAまたはMID 4460 ゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするために十分なオリゴヌクレオチド）であり得る。診断アッセイにおける用途のための他の適切なプローブが、本明細書中に記載される。

#### 【0253】

一つの形式において、mRNA（またはcDNA）は、例えば、単離されたmRNAをアガロースゲルで電気泳動し、ゲルからニトロセルロースのような膜にmRNAを移すことによって表面に固定され、そしてプローブに接触させられる。別の形式において、例えば、2次元遺伝子チップアレイにおいて、このプローブは、表面に固定され、そしてmRNA（またはcDNA）が、プローブに接触させられる。当業者は、MID 4460 遺伝子にコードされるmRNAのレベルを検出する用途のために、公知のmRNA検出方法を採用し得る。

10

#### 【0254】

MID 4460 の1つにコードされるmRNAのサンプル中のレベルは、例えば、rtPCR（Mullis（1987）米国特許第4,683,202号）、リガーゼ連鎖反応（Barany（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189~193）、自己持続性（self sustained）配列複製（Guatelliら、（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874~1878）、転写性増幅システム（Kwohら、（1989）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173~1177）、Q-Beta Replicase（Lizardiら、（1988）Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardiら、米国特許第5,854,033号）または任意の他の核酸増幅方法による核酸増幅（当該分野で公知の技術を使用する増幅化分子の検出が続く）で評価され得る。本明細書中で使用される場合、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域（それぞれプラス鎖およびマイナス鎖、またはその逆も同様）にアニールし得、そして間に短い領域を有する核酸分子の対として規定される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。このようなプライマーは、適切な条件下そして適切な試薬を用いて、プライマーに隣接されるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

20

30

#### 【0255】

インサイチュ方法に関して、細胞サンプルまたは組織サンプルは、調製/処理され、そして支持体（代表的にはガラススライド）に固定され、そして次いで、解析されるMID 4460 遺伝子をコードするmRNAにハイブリダイズし得るプローブと接触させられ得る。

#### 【0256】

別の実施形態において、この方法は、コントロールサンプルを、MID 4460 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せ、そしてコントロールサンプル中のMID 4460 mRNAまたはゲノムDNAの存在を試験サンプル中のMID 4460 mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する工程をさらに含む。なお別の実施形態において、米国特許第5,695,937号に記載されるような遺伝子発現の連続解析が、MID 4460 転写物レベルを検出するために使用される。

40

#### 【0257】

MID 4460 にコードされるタンパク質のレベルを決定するために、種々の方法が使用される。一般に、これらの方法として、サンプル中のタンパク質レベルを評価するために、このタンパク質に選択的に結合する薬剤（例えば、抗体）をサンプルと接触させる工程を含む。好ましい実施形態において、この抗体は、検出可能な標識を有する。抗体は、ポリクローナル、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>）が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、検出可能な物質をプローブまたは抗

50

体にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブあるいは抗体の直接標識、および検出可能な物質との反応性によるプローブあるいは抗体の関節標識を含むことが意図される。検出可能な物質の例は、本明細書中に提供される。

【0258】

この検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中のM I D 4460タンパク質を検出するために使用され得る。M I D 4460タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、免疫沈降、免疫蛍光、酵素免疫アッセイ（E I A）、放射性免疫アッセイ（R I A）、およびウエスタンブロット解析が挙げられる。M I D 4460タンパク質の検出のためのインビボ技術としては、被験体中に標識化抗M I D 4460抗体を導入する技術が挙げられる。例えば、この抗体は、被験体中の存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーで標識され得る。

10

【0259】

別の実施形態において、この方法は、コントロールサンプルをM I D 4460タンパク質を検出し得る化合物あるいは薬剤と接触させ、そしてコントロールサンプル中のM I D 4460タンパク質の存在を、試験サンプル中のM I D 4460タンパク質の存在と比較する工程をさらに含む。

【0260】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるM I D 4460の存在を検出するためのキットを含む。例えば、このキットは、生物学的サンプル中のM I D 4460タンパク質またはM I D 4460 m R N Aを検出し得る化合物または薬剤；および標準物質を備え得る。この化合物または薬剤は、適切な容器に充填され得る。このキットはM I D 4460タンパク質または核酸を検出するためにキットを使用するための指示書をさらに備え得る。

20

【0261】

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

【0262】

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

30

40

【0263】

本明細書中に記載される診断方法は、誤発現されているかまたは異常かまたは望ましくないM I D 4460の発現または活性に関連付けられる疾患または障害を有する被験体あるいはそのような疾患または障害を発症する危険性がある被験体を同定し得る。本明細書中で使用される場合、用語「望ましくない」は、生物学的応答に関与する望ましくない現象（例えば、疼痛または調節されていない細胞増殖）を含む。

【0264】

1つの実施形態において、異常なまたは望ましくないM I D 4460の発現または活性に関連する疾患または障害が同定される。試験サンプルが被験体から得られ、そしてM I D 4460のタンパク質または核酸（例えば、m R N AまたはゲノムD N A）が評価さ

50

れる。ここでは、M I D 4460のタンパク質または核酸のレベル（例えば、存在または非存在）により、異常なまたは望ましくないM I D 4460の発現または活性に関連する疾患または障害を有する被験体あるいはそのような疾患または障害を発症する危険性がある被験体が診断される。本明細書中で使用される場合、「試験サンプル」は、目的の被験体から得られる生物学的サンプル（生物学的液体（例えば、血清）、細胞サンプルまたは組織を含む）をいう。

#### 【0265】

本明細書中に記載される予後アッセイを使用することにより、被験体が、異常なまたは望ましくないM I D 4460の発現または活性に関連する疾患または障害を処置するために薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模擬体、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補）を投与され得るか否かについて決定し得る。例えば、このような方法を使用して、被験体が、心臓血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、アンギナ、冠状動脈疾患、発作など）について薬剤で有効に処置され得るか否かを決定し得る。

10

#### 【0266】

本発明の方法をまた使用して、M I D 4460遺伝子にける遺伝子改変を検出し得、それにより、改変された遺伝子を有する被験体が、M I D 4460タンパク質活性またはM I D 4460核酸発現における調節不全によって特徴付けられる障害（例えば、心臓血管障害）についての危険性があるか否かを決定し得る。好ましい実施形態において、この方法は、被験体由来のサンプル中において、M I D 4460タンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす少なくとも1つの改変またはM I D 4460遺伝子の誤発現によって特徴付けられる遺伝子改変の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、このような遺伝子改変は、以下のうちの少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：1）M I D 4460遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；2）M I D 4460遺伝子に対する1つ以上のヌクレオチドの付加；3）M I D 4460遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換；4）M I D 4460遺伝子の染色体再配列；5）M I D 4460遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける改変；6）M I D 4460遺伝子の（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの）異常な改変；7）M I D 4460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）M I D 4460タンパク質の非野生型レベル；9）M I D 4460遺伝子の対立遺伝子欠損；および10）M I D 4460タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

20

30

#### 【0267】

変更は、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、あるいは連結連鎖反応（LCR）においてプローブ/プライマーを用いずに検出され得る。この後者は、M I D 4460遺伝子中の点変異を検出するために特に有用であり得る。この方法は、細胞サンプルを被験体から収集する工程、核酸（例えば、ゲノム核酸、mRNAまたは両方）をこのサンプルから単離する工程、この核酸サンプルを、M I D 4460遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が（存在する場合）生じるような条件下で、M I D 4460遺伝子に特異的にハイブリダイズする1以上のプライマーと接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは不存在を検出する工程、または増幅産物のサイズを検出してその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。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用いられる技術のうちのいずれかと共に、予備的増幅工程として使用することが所望され得ることが予期される。あるいは、本明細書中に記載されるかまたは当該分野で公知の他の増幅方法が用いられ得る。

40

#### 【0268】

別の実施形態では、サンプル細胞由来のM I D 4460遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更を検出することによって同定され得る。例えば、サンプルDNA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以上の制限工

50



ンドヌクレアーゼで消化され、そして例えば、ゲル電気泳動によってフラグメント長サイズが決定されて比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの相違は、このサンプルDNAにおける変異を示す。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）の使用を用いて、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し得る。

#### 【0269】

他の実施形態では、MID 4460における遺伝的変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA）を二次元アレイ（例えば、チップベースのアレイ）にハイブリダイズすることによって同定され得る。このようなアレイは、複数のアドレスを含み、このアドレスの各々は、互いに位置的に識別可能である。異なるプローブは、この複数のうちの各アドレスに位置する。このアレイは、高密度アドレスを有し得る（例えば、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る（Croninら（1996）*Human Mutation* 7:244-255; Kozalら（1996）*Nature Medicine* 2:753-759））。例えば、MID 4460における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら（前出）に記載されるような光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短に述べると、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロール中のDNAの長いストレッチ全体をスキャンして、連続した重複プローブの線形アレイを作製することによって、配列間の塩基塩化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に続いて、検出される全ての改変体または変異に相補的な、より小さな特化プローブアレイを用いることによって、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行われる。各変異アレイは、並行プローブセットから構成され、その一方は、野生型遺伝子に相補的であり、そして他方は変異体遺伝子に相補的である。

10

20

#### 【0270】

なお別の実施形態では、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを用いて、MID 4460遺伝子を直接的に配列決定し得、そしてサンプルMID 4460の配列と、対応する野生型（コントロール）配列との比較によって変異を検出し得る。質量分析法によって配列決定することを含め、診断アッセイ（Naevéら（1995）*Biotechnology* 19:448-53）を行う場合、自動化配列決定手順が利用され得る。

30

#### 【0271】

MID 4460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、切断因子からの防御を用いて、RNA/RNAヘテロ二重鎖またはRNA/DNAヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法（Myersら（1985）*Science* 230:1242; Cottonら（1988）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleebaら（1992）*Methods Enzymol.* 217:286-295）が挙げられる。

#### 【0272】

なお別の実施形態では、ミスマッチ切断反応は、細胞サンプルから得られたMID 4460 cDNAにおける点変異を検出してマッピングするための規定の系において、2本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1以上のタンパク質（いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素）を用いる。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチにおいてAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにおいてTを切断する（Hsuら（1994）*Carcinogenesis* 15:1657-1662; 米国特許第5,459,039号）。

40

#### 【0273】

他の実施形態では、電気泳動移動度における変化を用いて、MID 4460遺伝子における変異を同定する。例えば、1本鎖コンホメーション多型（SSCP）を用いて、変異体核酸と野生型核酸との間での、電気泳動移動度における相違を検出し得る（Oritaら（1989）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 86:2766、Co

50

t t o n ( 1 9 9 3 ) M u t a t . R e s . 2 8 5 : 1 2 5 - 1 4 4 もまた参照のこと ;  
 および H a y a s h i ( 1 9 9 2 ) G e n e t . A n a l . T e c h . A p p l . 9 : 7  
 3 - 7 9 ) 。 サンプル M I D 4 4 6 0 核酸の 1 本鎖 D N A フラグメントおよびコント  
 ロール M I D 4 4 6 0 核酸の 1 本鎖 D N A フラグメントを変性させ、そして再生させる。  
 1 本鎖核酸の二次構造は配列に依存して変化し、その結果得られる、電気泳動移動度にお  
 ける変化は、1 塩基変化でさえも検出を可能にする。この D N A フラグメントは、標識プ  
 ロープを用いて標識または検出され得る。このアッセイの感度は、( D N A よりもむしろ )  
 R N A を用いることによって増強され得る。R N A においては、二次構造は、配列にお  
 ける変化に対してより敏感である。好ましい実施形態では、本方法は、ヘテロ二重鎖分析  
 を利用して、電気泳動移動度における変化に基づいて 2 本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離する 10  
 ( K e e n ら ( 1 9 9 1 ) T r e n d s G e n e t 7 : 5 ) 。

#### 【 0 2 7 4 】

なお別の実施形態において、変性剤勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける変異体フ  
 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 ( D G G E ) ( M  
 y e r s ら ( 1 9 8 5 ) N a t u r e 3 1 3 : 4 9 5 ) を使用してアッセイされる。D  
 G G E を分析法として使用する場合、D N A は、完全には変性しないことを確実にするた  
 めに、例えば、約 4 0 b p の高融解性 G C リッチ D N A である G C クランプを P C R によ  
 って付加することによって改変される。さらなる実施形態では、温度勾配を変性勾配の代  
 わりに使用して、コントロール D N A の移動度とサンプル D N A の移動度との相違が同定 20  
 される ( R o s e n b a u m および R e i s s n e r ( 1 9 8 7 ) B i o p h y s C h e m 2 6 5 : 1 2 7 5 3 ) 。

#### 【 0 2 7 5 】

点変異を検出するための他の技術の例としては、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイ  
 ゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長 ( S a i k i ら ( 1 9 8 6 ) N a  
 t u r e 3 2 4 : 1 6 3 ) ; S a i k i ら ( 1 9 8 9 ) P r o c . N a t l A c a d  
 . S c i U S A 8 6 : 6 2 3 0 ) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 2 7 6 】

あるいは、選択的 P C R 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と共に使用  
 され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、その  
 分子の中心 ( その結果、増幅はディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存する ) 30  
 ( G i b b s ら ( 1 9 8 9 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 1 7 : 2 4 3 7 - 2  
 4 4 8 ) または 1 つのプライマーの最 3 ' 末端において目的の変異を保有し得、ここで、  
 適切な条件下において、ミスマッチは、ポリメラーゼ伸長を防止し得るかまたは低下させ  
 得る ( P r o s s n e r ( 1 9 9 3 ) T i b t e c h 1 1 : 2 3 8 ) 。さらに、切断ベ  
 ースの検出を行うために変異領域に新規の制限部位を導入することが所望され得る ( G a  
 s p a r i n i ら ( 1 9 9 2 ) M o l . C e l l P r o b e s 6 : 1 ) 。特定の実施  
 形態では、増幅をまた、増幅のための T a q リガーゼを使用して実施し得ることが予期さ  
 れる ( B a r a n y ( 1 9 9 1 ) P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A 8 8  
 : 1 8 9 - 9 3 ) 。このような場合、連結は、5 ' 配列の 3 ' 末端において完璧な一致が 40  
 存在する場合にのみ生じて、増幅の存在または不存在を探索することによって特定部位で  
 の既知の変異の存在を検出することを可能にする。

#### 【 0 2 7 7 】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも 1 つのプロ  
 ープ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによ  
 って実施され得る。このキットは、例えば、臨床設定において便利に使用されて、M I  
 D 4 4 6 0 遺伝子に関与する疾患または病気の症状または家族歴を示す患者が診断され  
 得る。

#### 【 0 2 7 8 】

( 代理マーカーとしての M I D 4 4 6 0 分子の使用 )

本発明の M I D 4 4 6 0 分子もまた、被験体の、障害もしくは疾患状態のマーカーとし 50

て、疾患状態の前兆についてのマーカーとして、疾患状態の素因についてのマーカーとして、薬物活性のマーカーとして、または薬理ゲノム学的 (pharmacogenomic) プロフィールのマーカーとして有用である。本明細書中に記載される方法を用いて、本発明の MID 4460 分子の存在、不存在および/または量が検出され得、そしてインビボでの1以上の生物学的状態と関連付けられ得る。例えば、本発明の MID 4460 分子は、1以上の障害もしくは疾患状態についての、または疾患状態につながる状態についての、代理マーカーとして役立ち得る。本明細書中で用いられる場合、「代理マーカー」は、疾患もしくは障害の存在もしくは不存在と、または疾患もしくは障害の進行と(例えば、腫瘍の存在または不存在と)関連する、客観的生化学的マーカーである。このようなマーカーの存在または量は、疾患とは独立している。それゆえ、これらのマーカーは、特定の処置経過が、疾患状態または障害を低下させる際に有効であるか否かを示すのに役立ち得る。代理マーカーは、疾患状態もしくは障害の存在もしくは程度を、標準的方法論を通して評価することが困難である場合(例えば、初期段階の腫瘍)に、または潜在的に危険な臨床的終点に到達する前に疾患の進行の評価が所望される場合に、特に有用なものである(例えば、心筋梗塞または十分に発達した AIDS の望ましくない臨床結果よりも十分に前に、代理マーカーとしてコレステロールレベルを用いて、心臓血管疾患の評価が行われ得、そして HIV 感染の分析が、代理マーカーとして HIV RNA レベルを用いて行われ得る)。当該分野における代理マーカーの使用の例としては、Koomenら(2000) J. Mass. Spectrom. 35: 258 - 264; および James(1994) AIDS Treatment News Archive 209 が挙げられる。 10 20

#### 【0279】

本発明の MID 4460 分子はまた、薬力学的マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬力学的マーカー」は、薬物の効果に特異的に関連する客観的な生化学的マーカーである。薬力学的マーカーの存在または量は、薬物が投与される疾患状態または障害には関連せず、それ故、このマーカーの存在または量は、被験体における薬物の存在または活性を示す。例えば、薬力学的マーカーは、そのマーカーが、薬物のレベルに関連して、この組織の中で、発現するかもしれないか、または発現も転写もされないかのいずれかであるという点で生物学的組織における薬物の濃度を示し得る。この状態において、薬物の分布または摂取は、薬力学的マーカーによってモニターされ得る。同様に、薬力学的マーカーの存在または量は、薬物の代謝生成物の存在または量に関連し得、その結果、マーカーの存在または量は、インビボでの薬物の相対的分解速度を示す。薬力学的マーカーは、薬物効果の検出の感度の増加において、特に薬物が低用量で投与される場合に、特に有益である。少量の薬物でさえ、複数回のマーカー(例えば、MID 4460 マーカー)の転写または発現を、活性化するために十分であり得るので、増幅されたマーカーは、薬物そのものよりも容易に検出される量で存在し得る。また、このマーカーは、マーカーそのものの性質に起因してより容易に検出され得; 例えば、本明細書中に記載される方法を使用して、抗 MID 4460 抗体は、MID 4460 タンパク質マーカーのための免疫ベースの検出系に使用され得るか、または MID 4460 特異的放射標識プローブは、MID 4460 mRNA マーカーを検出するために使用され得る。さらに、薬力学的マーカーの使用は、直接観測が可能な範囲を超える薬物処置に起因する危険性の機構ベースの予測を提供し得る。当該分野における薬力学的マーカーの使用の例としては、Matsudaら、米国特許第 6,033,862 号; Hattisら、(1991) Env. Health Perspect. 90: 229 - 238; Schentag(1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺 3: S21 - S24; および Nicolaou(1999) Am. J. Health-Syst. Pharm. 56 補遺 3: S16 - S20 が挙げられる。 30 40

#### 【0280】

本発明の MID 4460 分子はまた、薬力学的マーカーとして有用である。本明細書中で使用される場合、「薬力学的マーカー」は、被験体における特定の臨床的薬物応答また 50

は薬物感受性と関連する客観的な生物学的マーカーである（例えば、McLeodら、（1999）Eur. J. Cancer 35:1650-1652を参照のこと）。薬力学的マーカーの存在または量は、薬物の投与前に、特定の薬物または薬物のクラスに対して予測される被験体の応答に関連する。被験体における1つ以上の薬力学的マーカーの存在または量を評価することによって、被験体に対して最も適切であるかまたはより大きな成功の程度を有すると予測される薬物療法の、選択され得る。例えば、被験体における特定の腫瘍マーカーに対する、RNAまたはタンパク質（例えば、MID 4460タンパク質またはMID 4460 RNA）の存在または量に基づいて、被験体中に存在する可能性のある特定の腫瘍の処置に対して最適化された、薬物または処置の過程が選択され得る。同様に、MID 4460 DNAにおける特定の配列の変異の存在または非存在は、MID 4460薬物応答に関連し得る。従って、薬力学的マーカーの使用によって、治療を施与する必要なしに、各被験体に対して最も適切な治療の適用が可能になる。

10

#### 【0281】

（薬学的組成物）

本発明の核酸およびポリペプチド、これらのフラグメント、ならびに抗MID 4460抗体（本明細書中では、「活性化合物」ともいわれる）は、薬学的組成物に組込まれ得る。このような組成物は、代表的には、核酸分子、タンパク質、または抗体および薬学的に受容可能なキャリアを包含する。本明細書中で使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与と適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。補充活性化合物もまた、組成物に組込まれ得る。

20

#### 【0282】

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

30

#### 【0283】

注射用途に適する薬学的組成物は、滅菌水溶液（水溶性の場合）または滅菌分散物および滅菌注射可能な溶液または分散物の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアは、生理学的食塩水、静菌性水、Cremophor EL<sup>TM</sup>（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は、滅菌状態でなければならず、容易に注射可能である程度の流体であるべきである。この組成物は、製造および貯蔵の状態下で安定であるべきであり、細菌および真菌のような微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散剤であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用、分散物の場合の必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（mannitol）、ソルビトール）、塩化ナトリウム）を組成物中に含むことが好ましい。注

40

50

射可能な組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含有することによって、引き起こされ得る。

【0284】

注射可能な滅菌溶液は、上に列挙される成分の1つまたは組み合わせを含む適切な溶媒中に、必要な量で活性な化合物を組み込むことによって（必要な場合、その後、濾過滅菌することによって）調製され得る。一般的に、分散物は、基本分散剤および上に列挙される成分からの他に必要とされる成分を含有する安定なビヒクルに、活性な化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注入可能な溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これらは、前に滅菌濾過されたその溶液から、活性な成分および任意のさらに所望される成分の粉末を得る。

10

【0285】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈物または食用キャリアを含む。経口治療投与の目的のために、活性な化合物は、賦形剤に組み込まれ、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤（例えば、ゼラチンカプセル剤）の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬としての用途のために流体キャリアを使用して、調製され得る。薬学的に適合可能な結合剤および/またはアジュバント物質が、組成物の一部として含有され得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分または類似した性質の化合物のいずれかを含み得る：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、スターチまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチ）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはStearate）；流動促進剤（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香料（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、または、オレンジ香料）。

20

【0286】

吸入による投与のため、化合物は、適切な噴射体（例えば、二酸化炭素のような気体）または噴霧器を備える、加圧された容器またはディスペンサーからエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0287】

全身投与はまた、経粘膜的手段または経皮的手段によってであり得る。経粘膜的投与または経皮的投与について、浸透されるべき障害に適切な浸透剤は、処方物において使用される。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知であり、例えば、経皮的投与のための界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜的投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を介して達成され得る。経皮的投与について、活性な化合物は、当該分野で一般的に公知のものとして、軟膏（ointment）、軟膏剤（salve）、ゲル、またはクリーム中に処方される。

30

【0288】

化合物はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、従来の坐剤基剤（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド）を有する）または停留浣腸の形態で投与され得る。

【0289】

1つの実施形態において、活性な化合物は、キャリアと共に調製され、このキャリアは、身体からの迅速な除去に対して化合物を保護し、例えば、徐放性処方物（移植片および微小カプセル化送達系を含む）である。生体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。このような処方物の調製方法は、当業者に明らかである。これらの材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販入手され得る。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とともに感染細胞に対して標的化されたりポソームを含む）はまた、薬学的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。

40

## 【0290】

投与の容易さおよび投与用量の一樣性のために、投与単位形態での経口的組成物または非経口的組成物を処方することは有利である。本明細書中で使用される場合、投与単位形態は、処置される被験体に対する単一投与量として適切な、物理的に別個の単位をいい；各単位は、必要な薬学的なキャリアに関連する所望の治療効果を生成するように計算された所定の量の活性な化合物を含む。

## 【0291】

このような化合物の毒性および治療効力は、例えば、 $LD_{50}$ （集団の50%に対して致死である用量）および $ED_{50}$ （集団の50%における治療有効用量）を決定することについて、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。10  
毒性と治療効果との間の用量比が、治療指数であり、そしてこの比は、 $LD_{50} / ED_{50}$ として示され得る。高い治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物が使用される一方で、非感染細胞に対する潜在的な傷害を最小化するために罹患組織の部位にこのような化合物を標的化する送達システムを設計するために配慮し、それによって副作用を減少するべきである。

## 【0292】

細胞培養物アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける用途のための一定範囲の投与量を処方することにおいて使用され得る。このような化合物の投与量は、好ましくは、毒性をほとんどかまたは全く有さずに、 $ED_{50}$ を含む一定範囲の循環濃度内に入る。投与量は、使用される用量形態または使用される投与経路に依存して、この範囲20  
内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイから見積もられ得る。用量は、動物モデルにおいて処方され得、細胞培養物において決定される $IC_{50}$ （すなわち、症状の最高阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成する。このような情報は、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。

## 【0293】

本明細書中に定義される場合、治療有効量のタンパク質またはポリペプチド（すなわち、有効投与量）は、約0.001～30mg/体重1kg、好ましくは約0.01～25mg/体重1kg、より好ましくは約0.1～20mg/体重1kg、およびさらにより好30  
ましくは約1～10mg/体重1kg、2～9mg/体重1kg、3～8mg/体重1kg、4～7mg/体重1kg、または5～6mg/体重1kgの範囲にある。このタンパク質またはポリペプチドは、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、およびさらにより好ましくは約4、5または6週間投与され得る。当業者は、特定の因子が、有効に被験体を処置するために必要な投与量およびタイミングに影響し得、これらの因子としては、疾患または障害の重篤度、以前の処置、被験体の全身の健康状態および/または年齢、および他に存在する疾患が挙げられるがこれらに限定されないことを認識する。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体（本明細書中に記載されるような非結合状態であっても結合体化していても）での被験体の処置は、単一处置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み40  
得る。

## 【0294】

抗体について、好ましい投与量は、0.1mg/体重1kg（一般的に、10mg/kg～20mg/kg）である。抗体が脳において作用する場合、50mg/kg～100mg/kgの投与量が、通常好ましい。一般的に、部分的ヒト抗体および完全なヒト抗体は、人体内で他の抗体より長い半減期を有する。従って、より低い投与量およびより少ない投与頻度が、しばしば可能である。改変（例えば、脂質化）は、抗体を安定化させ、そして取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を強化するために使用され得る。抗体の脂質化のための方法は、Cruikshankら、（（1997）J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Re 50

t r o v i r o l o g y 1 4 : 1 9 3 ) によって記載される。

【 0 2 9 5 】

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、このような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物（例えば、ペプトイド）、アミノ酸、アミノ酸類似物、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似物、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似物、1モル当たり約10,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物（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）、1モル当たり約5,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、1モル当たり約1,000gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、1モル当たり約500gより低い分子量を有する有機化合物または無機化合物、ならびにこ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。

10

【 0 2 9 6 】

例示的な用量は、被験体重量1kgまたはサンプル重量1kg当たりの低分子のミリグラム重またはマイクログラム量を含む（例えば、約1μg/kg～約500mg/kg、約100μg/kg～約5mg/kg、または約1μg～約50μg/kg）。さらに、低分子の適切な用量は、調節されるべき発現または活性という点で低分子の効力に依存する。1つ以上のこれらの低分子が本発明のポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するために動物（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、まず相対的に低い用量を処方し、続いて適切な応答が得られるまで用量を増加させ得る。さらに、任意の特定の動物被験体に対する特定の用量レベルは、使用される特定の化合物の活性、被験体の年齢、体重、全身の健康状態、性別、および食事、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組み合わせ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む、種々の因子に依存することが、理解される。

20

【 0 2 9 7 】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され、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.U.S.A.91:3054-3057を参照のこと）によって、被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる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が組換え細胞（例えば、レトロウイルスベクター）からインタクトで産生され得る場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

30

【 0 2 9 8 】

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

【 0 2 9 9 】

（治療方法）

本発明は、障害の危険性がある（もしくはそれに対して感受性である）被験体、または異常もしくは望まれないMID 4460の発現もしくは活性に関連する障害を有する被験体を処置する予防法または治療法の両方を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「処置」は、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を、治療、治癒、緩和、軽減、改変、矯正、回復、改善するかまたはこれらに影響を与えることを目的とした、疾患、疾患の症状または疾患に対する素因を有する患者に対する治療剤の適用または投与、この患者由来の単離された組織または細胞株に対する治療剤の適用または投与として定義される。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。

40

【 0 3 0 0 】

処置の予防法および治療法の両方に関して、このような処置は、薬理ゲノム学の分野から

50

得られる知識に基づいて、特別に調整され得るか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」は、臨床開発において、および市場での、薬物へのゲノム技術（例えば、遺伝子配列決定、統計遺伝学、および遺伝子発現分析）の適用をいう。より詳細には、この用語は、患者の遺伝子が、薬物に対するこの患者の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）をどのようにして決定するかの研究をいう。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 MID 4460 分子または MID 4460 調節因子のいずれかを用いて、個々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。薬理ゲノム学は、臨床医または医師が、予防処置または治療処置を、その処置から最も恩恵を受ける患者に対して標的化し、そして薬物関連の毒性副作用を経験する患者の処置を避けるのを可能にする。

10

**【0301】**

1つの局面において、本発明は、MID 4460 または MID 4460 の発現もしくは少なくとも1つの MID 4460 活性を調節する薬剤を被験体に投与することによって、異常なまたは望まれない MID 4460 の発現または活性に関連する疾患または状態を被験体において予防するための方法を提供する。異常なまたは望まれない MID 4460 の発現または活性によって引き起こされるかまたはそれに起因する疾患に対する危険性がある被験体は、例えば、本明細書中に記載されるような診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはそれらの組み合わせによって同定され得る。予防剤の投与は、MID 4460 の異常に特有の症状の発現前に行われ得、その結果、疾患または障害が、予防されるか、あるいは、その進行が遅延される。MID 4460 の異常の種類に依存して、例えば、MID 4460 薬剤、MID 4460 アゴニスト薬剤または MID 4460 アンタゴニスト薬剤が、この被験体を処置するために使用され得る。適切な薬剤は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

20

**【0302】**

いくつかの MID 4460 障害が、異常なレベルの遺伝子産物または異常な活性を示す遺伝子産物の存在によって、少なくとも部分的に引き起こされ得る。それゆえ、このような遺伝子産物のレベルおよび/または活性の減少は、障害の症状の改善をもたらす。

**【0303】**

MID 4460 分子は、1以上の心臓血管障害および肝臓障害（これらの全ては上記に記載される）を制御するための新規の診断標的および新規の治療剤として作用し得る。本発明の分子はまた、細胞増殖障害および/または細胞分化障害、骨代謝関連障害、免疫（例えば、炎症）障害、内皮細胞障害、ウイルス疾患、疼痛障害および代謝障害のうちの1以上を制御するための新規の診断標的および新規の治療薬剤として作用し得る。

30

**【0304】**

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

**【0305】**

本明細書中で用いられる場合、用語「癌」（用語「過剰増殖性」および「新生物性」とも交換可能に用いられる）とは、自律増殖する能力を有する（すなわち、迅速に増殖する細胞増殖によって特徴付けられる、異常な状況または状態の）細胞をいう。癌性疾患状態は、病的（すなわち、疾患状態を特徴付けるかまたは構成する；例えば、悪性腫瘍増殖）と分類され得るか、または非病的（すなわち、正常状態からは逸脱しているが、疾患状態とは関連していない；例えば、創傷修復に関連した細胞増殖）と分類され得る。この用語は、組織病理学的型または侵襲性の段階にかかわらず、全ての型の癌性増殖または発癌プロセス、転移性組織または悪性形質転換細胞、悪性形質転換組織もしくは悪性形質転換器官を包含しなければならない。用語「癌」は、種々の器官系の悪性疾患（例えば、肺、胸部、甲状腺、リンパ管、胃腸管、および尿生殖管に罹患する悪性疾患）、ならびに腺癌（これは、大部分の結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌および/または精巣腫瘍のような悪性疾患を

40

50



包含する)、肺の非小細胞癌、小腸癌および食道癌を包含する。用語「癌腫」は、当該分野で認識されており、そして上皮組織または内分泌組織の悪性疾患(呼吸器系癌腫、胃腸系癌腫、泌尿生殖器系癌腫、精巣癌腫、胸部癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、および黒色腫を包含する)をいう。例示的な癌腫としては、子宮頸部、肺、前立腺、胸部、頭部および頸部、結腸ならびに卵巣の組織から形成される癌腫が挙げられる。用語「癌腫」はまた、癌肉腫を包含し、例えば、これは、癌性でかつ肉腫性の組織から構成される悪性腫瘍を包含する。「腺癌」とは、腺組織に由来する癌腫、または腫瘍細胞が認識可能な腺構造を形成する癌腫をいう。用語「肉腫」は、当該分野で認識されており、間葉誘導物である悪性腫瘍をいう。

#### 【0306】

本発明のMID 4460分子を用いて、種々の増殖性障害をモニタリング、処置および/または診断し得る。このような障害としては、造血新生物障害が挙げられる。本明細書中で用いられる場合、用語「造血新生物障害」としては、(例えば、骨髓系統、リンパ系統もしくは赤血球系統またはそれらの前駆細胞から生じる)造血起源の過形成細胞/新生物細胞を含む疾患が挙げられる。好ましくは、この疾患は、ほとんど分化していない急性白血病(例えば、赤芽球性白血病および急性巨核芽球性白血病)から生じる。さらなる例示的な骨髓障害としては、急性前骨髓球白血病(APML)、急性骨髓性白血病(AML)および慢性骨髓性白血病(CML)(Vaicikus(1991)Critt Rev. in Oncol./Hematol. 11:267-97において概説される)が挙げられるがこれらに限定されない;リンパ性悪性疾患としては、急性リンパ芽球性白血病(ALL)(これは、B系統ALLおよびT系統ALLを包含する)、慢性リンパ性白血病(CLL)、前リンパ球性白血病(PLL)、毛様細胞性白血病(HLL)およびヴァルデンストレーママクログロブリン血症(WM)が挙げられるがこれらに限定されない。さらなる形態の悪性リンパ腫としては、非ホジキンリンパ腫およびその変種、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、皮膚T細胞リンパ腫(CTCL)、大型顆粒リンパ球白血病(LGF)、ホジキン病およびリード-スターンバーグ疾患が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0307】

MID 4460分子の異常な発現および/または活性は、骨代謝に関連した障害を媒介し得る。「骨代謝」とは、カルシウムおよびホスフェートの血清中濃度に最終的に影響を与え得る、骨構造の形成または変性(例えば、骨形成、骨吸収など)における、直接的または間接的な影響をいう。この用語はまた、その後に骨形成および骨変性をもたらし得る、骨細胞(例えば、破骨細胞および骨芽細胞)中の、MID 4460分子によって媒介される活性を包含する。例えば、MID 4460分子は、骨吸収性破骨細胞の異なる活性(例えば、単球および単核食細胞から破骨細胞への分化の刺激)を支持し得る。従って、骨細胞の産生を調整するMID 4460分子は、骨形成および骨変性に影響を与え得、従って、骨障害を処置するために用いられ得る。このような障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:骨粗鬆症、骨形成異常、骨軟化症、くる病、嚢胞性線維性骨炎、腎性骨形成異常、骨硬化症、鎮痙処置、骨減少症、骨線維形成不全(fibrogenesis-imperfecta ossium)、続発性上皮小体機能亢進症、上皮小体機能低下症、上皮小体機能亢進症、肝硬変、閉塞性黄疸、薬物誘発性代謝、髄様癌、慢性腎臓病、くる病、サルコイドーシス、グルココルチコイド拮抗作用、吸収不良症候群、脂肪便、熱帯性スプルー、特発性高カルシウム血症および授乳熱。

#### 【0308】

本発明のMID 4460核酸およびMID 4460タンパク質を用いて、種々の免疫(例えば、炎症性(例えば、呼吸炎症性))障害を処置および/または診断し得る。免疫性および炎症性の障害または疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:自己免疫疾患(例えば、真性糖尿病、関節炎(慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、変形性関節症、乾癬性関節炎を包含する)、多発性硬化症、脳脊髄炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎および

10

20

30

40

50

湿疹性皮膚炎を包含する)、乾癬、シェーグレン症候群、炎症性腸疾患(例えば、クローン病および潰瘍性大腸結腸炎)、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、喘息、アレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾患、皮膚エリテマトーデス、強皮症、膣炎、直腸炎、薬疹、らい病逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳障害、特発性両側性進行性感音聴力損失、再生不良性貧血、赤芽球ろう、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェーゲナー肉芽腫症、慢性活性肝炎、スティーヴンズ-ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、グレーヴズ病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、および間質性肺線維症を包含する)、対宿主性移植片病、移植の症例、およびアレルギー(例えば、アトピー性アレルギー)。

### 【0309】

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

### 【0310】

本明細書中で用いられる場合、「内皮細胞障害」は、異常な、調節されていない、もしくは望まれていない内皮細胞活性(例えば、増殖、移動、新脈管形成、もしくは血管新生); または細胞表面接着分子または新脈管形成に関連した遺伝子(例えば、TIE-2、FLTおよびFLK)の異常な発現によって特徴付けられる障害を包含する。内皮細胞障害としては、腫瘍形成、腫瘍転移、乾癬、糖尿病性網膜症、子宮内膜症、グレーヴズ病、虚血性疾患(例えば、アテローム性動脈硬化症)、および慢性炎症疾患(例えば、慢性関節リウマチ)が挙げられる。

### 【0311】

本明細書中に記載される方法によって処置または診断され得る障害としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 肝臓における線維組織の蓄積に関連した障害(例えば、既存の線維の崩壊および縮合を伴う細胞外マトリクスの産生と分解との間の不均等から生じる障害)。本明細書中に記載される方法を用いて、ホメオスタシスをかき乱すプロセス(例えば、炎症性プロセス、毒性傷害または変化した肝臓血流から生じる組織損傷)、および感染(例えば、細菌、ウイルスおよび寄生生物の)を包含する、広範な種々の因子によって誘発される肝細胞壊死または肝細胞傷害を診断または処置し得る。例えば、この方法は、肝臓障害(例えば、門脈圧亢進高血圧または肝臓線維症)の早期検出のために用いられ得る。さらに、この方法を用いて、先天性代謝異常に起因する肝臓線維症(例えば、

10

20

30

40

50

蓄積障害（例えば、ゴシェ病（脂質異常）またはグリコーゲン蓄積症）から生じる線維症、A 1 - アンチトリプシン欠損）；外因性物質の蓄積（例えば、貯蔵）を媒介する障害（例えば、ヘモクロマトーシス（鉄過剰負荷症候群）および銅蓄積疾患（ウィルソン病））、毒性代謝産物の蓄積を生じる障害（例えば、チロシン血症、果糖血症およびガラクトース血症）ならびにペルオキシソーム障害（例えば、ツェルヴェーガー症候群）を検出し得る。さらに、本明細書中に記載される方法は、種々の化学物質または薬物（例えば、メトトレキサート、イソニアジド、オキシフェニサチン、メチルドパ、クロルプロマジン、トルブタミドまたはアルコール）の投与に関連した肝臓傷害、または肝臓での血管障害発現（例えば、肝臓内もしくは肝臓外のいずれかでの胆汁流動の閉塞、または例えば、慢性心不全、静脈閉塞病、門脈血栓症もしくはバッド - キアーリ症候群から生じる、肝臓循環における変化）を表す肝臓傷害の早期検出および早期処置に有用であり得る。

10

#### 【0312】

さらに、M I D 4460分子は、特定のウイルス疾患（B型肝炎、C型肝炎および単純疱疹ウイルス（H S V）が挙げられるが、これらに限定されない）の病因において重要な役割を果たし得る。M I D 4460活性の調節因子は、ウイルス疾患を制御するために使用され得る。この調節因子は、ウイルス感染組織またはウイルス関連組織の線維症（特に肝臓および肝臓線維症）の処置および／または診断において使用され得る。また、M I D 4460調節因子は、ウイルス関連癌腫（特に肝細胞癌）の処置および／または診断において使用され得る。

#### 【0313】

20

さらに、M I D 4460は、代謝障害または疼痛障害の調節において重要な役割を果たし得る。代謝不均衡の疾患としては、肥満、神経性食欲不振、悪液質、脂質障害および糖尿病が挙げられるが、これらに限定されない。疼痛障害の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：種々の形態の組織損傷（例えば、炎症、感染および虚血）の間に誘発される疼痛応答（通常、痛覚過敏と称される）（例えば、Fields, H. L. (1987) Pain, New York: McGraw-Hillに記載される）；筋骨格障害に関連する疼痛（例えば、関節痛、歯痛、頭痛）；手術に関連する疼痛；過敏性腸症候群に関連する疼痛；または胸部痛。

#### 【0314】

議論されるように、M I D 4460障害の首尾よい処置は、標的遺伝子産物の発現または活性を阻害する役目を果たす技術によって、もたらされ得る。例えば、ネガティブな調節性活性を示すことが証明されている化合物（例えば、上記のアッセイを使用して同定される因子）が、本発明に従って使用され、M I D 4460障害の症状を予防および／または回復し得る。このような分子としては、以下が挙げられ得るがこれらに限定されない：ペプチド、ホスホペプチド、有機低分子または無機低分子、あるいは抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、または単鎖抗体、ならびにFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFab発現ライブラリーフラグメント、scFV分子、ならびにそれらのエピトープ結合フラグメントを含む）。

30

#### 【0315】

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

40

#### 【0316】

変異体遺伝子発現を低下または阻害するための、アンチセンス分子、リボザイム分子および／または三重らせん分子の使用もまた、正常な標的遺伝子の対立遺伝子によって産生されるmRNAの転写（三重らせん）および／または翻訳（アンチセンス、リボザイム）を低下または阻害し得、その結果、存在する正常な標的遺伝子産物の濃度が、正常な表現型で必要とされる濃度よりも低くあり得る可能性がある。このような場合、正常な標的遺伝

50

子活性を示す標的遺伝子ポリペプチドをコードおよび発現する核酸分子は、遺伝子治療法によって、細胞に導入され得る。あるいは、この標的遺伝子が細胞外タンパク質をコードする例において、正常な標的遺伝子タンパク質を、細胞または組織に同時に投与して、必要な細胞活性レベルまたは組織標的遺伝子活性レベルを維持することが、好ましくあり得る。

#### 【0317】

核酸分子が、M I D 4460発現によって特徴付けられる疾患を処置または予防する際に利用され得る別の方法は、M I D 4460タンパク質に特異的なアプタマー分子の使用を介する。アプタマーは、三次構造を有する核酸分子であり、この三次構造は、それらがタンパク質リガンドに特異的または選択的に結合するのを可能にする（例えば、O s b o r n eら、(1997) C u r r . O p i n . C h e m B i o l . 1:5-9; およびP a t e l (1997) C u r r . O p i n . C h e m B i o l . 1:32-46を参照のこと）。核酸分子は、多くの場合において、治療タンパク質分子が標的細胞に導入されるよりも、より簡便に標的細胞に導入されるので、アプタマーは、多能性効果を有し得る薬物または他の分子を導入することなく、M I D 4460タンパク質活性が特異的に低下し得る方法を提供する。

10

#### 【0318】

標的遺伝子産物に特異的であり、かつ標的遺伝子産物活性を低下させる抗体が、作製され得る。従って、このような抗体は、ネガティブな調節技術が、M I D 4460障害の処置に適している場合に投与され得る。抗体の記載については、上記の抗体の節を参照のこと。

20

#### 【0319】

抗体産生を刺激するために、M I D 4460タンパク質またはエピトープで、動物またはヒト被験体を注射することが、被験体に対して有害である環境下において、抗イディオタイプ抗体の使用によって、M I D 4460に対する免疫応答を生じさせることが可能である（例えば、H e r l y n (1999) A n n M e d 31:66-78; ならびにB h a t t a c h a r y a - C h a t t e r j e eおよびF o o n (1998) C a n c e r T r e a t R e s . 94:51-68を参照のこと）。抗イディオタイプ抗体が哺乳動物またはヒト被験体に導入される場合、M I D 4460タンパク質に特異的であるべき、抗-抗イディオタイプ抗体の産生が刺激されるはずである。M I D 4460発現によって特徴付けられる疾患に対するワクチンもまた、この様式で作製され得る。

30

#### 【0320】

標的抗原が細胞内であり、かつ全抗体が使用される例において、内部移行抗体が好ましくあり得る。リポフェクチンまたはリポソームを使用して、標的抗原を細胞内に結合するF a b領域の抗体またはフラグメントを送達し得る。抗体のフラグメントが使用される場合、標的抗原に結合する最小の阻害性フラグメントが、好ましい。例えば、抗体のF v領域に対応するアミノ酸配列を有するペプチドが、使用され得る。あるいは、細胞内標的抗原に結合する一本鎖中和抗体もまた、投与され得る。このような一本鎖抗体は、例えば、標的細胞集団内の一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を発現させることによって、投与され得る（例えば、M a r a s c oら、(1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:7889-7893を参照のこと）。

40

#### 【0321】

標的遺伝子発現、合成および/または活性を阻害する、同定された化合物は、M I D 4460障害を予防、処置または回復するのに治療学的に有効な用量で、患者に投与され得る。治療学的に有効な用量とは、その障害の症状を回復させるのに十分な、化合物の量という。このような化合物の毒性および治療効果は、上記のような標準的な薬理学的手順によって、決定され得る。

#### 【0322】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投薬量範囲を処方する際に、使用され得る。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性

50

をほとんど有さないかまたは全く有さないED<sub>50</sub>を含む循環濃度範囲内にある。投薬量は、用いられる投薬形態および用いられる投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の方法において使用される任意の化合物について、治療学的に有効な用量は、細胞培養アッセイから、最初に確立され得る。用量は、動物モデルにおいて処方され得、細胞培養物中で決定されるようなIC<sub>50</sub>（すなわち、症状の最大半減阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲に達する。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定し得る。血漿レベルは、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。

#### 【0323】

個体に対する有効な用量を決定する別の例は、試験被験体の血清中の「遊離」化合物および「結合」化合物のレベルを直接的にアッセイする能力である。このようなアッセイは、分子のインプリンティング技術によって作製される抗体模倣物および/または「バイオセンサ」を使用し得る。MID 4460活性を調節し得る化合物は、テンプレート、または「インプリンティング分子」として使用され、この化合物の触媒試薬との重合化の前に、重合可能なモノマーを空間的に組織化する。インプリントされた分子のその後の除去は、化合物の繰り返し「ネガ(negative image)」を含むポリマーマトリクスを残し、そして生物学的アッセイ条件下で、分子に選択的に再結合することができる。この技術の詳細な総説は、Ansellら(1996) *Current Opinion in Biotechnology* 7: 89-94およびShea(1994) *Trends in Polymer Science* 2: 166-173において参照され得る。このような「インプリントされた」アフィニティマトリクスは、リガンド結合アッセイに適合し、これによって、固定化モノクローナル抗体の構成要素は、適切にインプリントされたマトリクスによって置き換えられる。この方法における、このようなマトリクスの使用の例は、Vlatakisら(1993) *Nature* 361: 645-647において参照され得る。同位体標識の使用によって、MID 4460の発現または活性を調節する化合物の「遊離」濃度は、容易にモニタリングされ得、そしてIC<sub>50</sub>の算出に使用され得る。

#### 【0324】

このような「インプリントされた」アフィニティマトリクスはまた、光子放射特性が標的化合物の局在性および選択的結合によって測定可能に変化する蛍光群を含むように設計され得る。これらの変化は、適切な光ファイバーデバイスを使用し、次いで、試験被験体における用量を、その個々のIC<sub>50</sub>に基づいて迅速に最適化することによって、実時間で容易にアッセイされ得る。このような「バイオセンサ」の基本的な例は、Krizら(1995) *Analytical Chemistry* 67: 2142-2144において議論されている。

#### 【0325】

本発明の別の局面は、治療目的のための、MID 4460発現または活性を調節する方法に関する。従って、例示的な実施形態において、本発明の調節方法は、細胞を、MID 4460またはこの細胞に関連するMID 4460タンパク質活性の1つ以上の活性を調節する因子と接触させる工程を包含する。MID 4460タンパク質活性を調節する因子は、本明細書中に記載されるような因子（例えば、核酸またはタンパク質、MID 4460タンパク質の天然に存在する標的分子（例えば、MID 4460基質またはレセプター）、MID 4460抗体、MID 4460アゴニストまたはアンタゴニスト、MID 4460アゴニストもしくはアンタゴニストのペプチド模倣物、または他の低分子）であり得る。

#### 【0326】

1つの実施形態において、この因子は、1つ以上のMID 4460活性を刺激する。このような刺激性因子の例としては、活性なMID 4460タンパク質およびMID 4460をコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この因子は、1つ以上のMID 4460活性を阻害する。このような阻害因子の例としては、アンチセンス

10

20

30

40

50

M I D 4 4 6 0 核酸分子、抗 M I D 4 4 6 0 抗体、および M I D 4 4 6 0 インヒビターが挙げられる。これらの調節方法は、インビトロにおいてか（例えば、この因子とともに細胞を培養することによって）、あるいはインビボにおいて（例えば、この因子を被験体に投与することによって）行われ得る。このように、本発明は、M I D 4 4 6 0 タンパク質または核酸分子の、異常なまたは望ましくない発現または活性によって特徴付けられる疾患または障害に罹患している個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、因子（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される因子）、または M I D 4 4 6 0 発現もしくは活性を調節する（例えば、アップレギュレートするかまたはダウンレギュレートする）因子の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、M I D 4 4 6 0 タンパク質または核酸分子を、低下した、異常なまたは望ましくない M I D 4 4 6 0 発現または活性を補償する治療として、投与する工程を包含する。

10

## 【0327】

M I D 4 4 6 0 活性の刺激は、M I D 4 4 6 0 が異常にダウンレギュレートする状況、および/または M I D 4 4 6 0 活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。例えば、M I D 4 4 6 0 活性の刺激は、M I D 4 4 6 0 がダウンレギュレートする状況、および/または M I D 4 4 6 0 活性の増加が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。同様に、M I D 4 4 6 0 活性の阻害は、M I D 4 4 6 0 が異常にアップレギュレートする状況、および/または M I D 4 4 6 0 活性の低下が有利な効果を有するようである状況において、望ましい。

20

## 【0328】

（薬理ゲノム学（*pharmacogenomics*））

本発明の M I D 4 4 6 0 分子、および因子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるような、M I D 4 4 6 0 活性（例えば、M I D 4 4 6 0 遺伝子発現）に対する刺激効果もしくは阻害効果を有するモジュレーターは、異常な M I D 4 4 6 0 活性または望ましくない M I D 4 4 6 0 活性に関連する、M I D 4 4 6 0 関連障害（例えば、異常であるかもしくは欠損したホスファターゼの活性もしくは発現、または心血管障害）を（予防的にまたは治療的に）処置するために、個体に投与され得る。このような処置とともに、薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と、外来性化合物もしくは薬物に対するその個体の応答との間の関係の研究）が、考慮され得る。治療の代謝における差異は、薬理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、毒性または治療不全を与えるように導き得る。従って、医師または臨床医は、M I D 4 4 6 0 分子または M I D 4 4 6 0 モジュレーターを投与するか否かを決定し、そして M I D 4 4 6 0 分子または M I D 4 4 6 0 モジュレーターでの処置における、投薬量および/または治療レジメンを変更する際に、等価な薬理ゲノム学研究において得られた知識の適用を考慮し得る。

30

## 【0329】

薬理ゲノム学は、変更された薬物配置および罹患した個人の異常な活性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異を処置する。例えば、E i c h e l b a u m ら、（1996）*C l i n . E x p . P h a r m a c o l . P h y s i o l .* 23 : 983 - 985 および L i n d e r ら、（1997）*C l i n . C h e m .* 43 : 254 - 266 を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学条件は、異なり得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する（変更された薬物作用）単一因子として普及したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する（変更された薬物代謝）単一因子として普及した。これらの薬理ゲノム学条件は、稀なゲノム欠損としてかまたは天然に存在する多型としてかの、いずれかとして生じ得る。例えば、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損（G6PD）は、一般的な遺伝性酵素病であり、ここで、主な臨床学的合併症は、酸化薬剤（抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取およびソラマメの消費後の溶血である。

40

## 【0330】

50

「ゲノムワイドアソシエーション ( genome - wide association ) 」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための、1つの薬理ゲノム学アプローチは、すでに知られているゲノム関連マーカー ( 例えば、「二座対立遺伝子」ゲノムマーカーマップ ( これは、60,000 ~ 100,000 の多型またはヒトゲノム上の可変性部位からなり、これらの各々が、2つの改変体を有する ) ) からなるヒトゲノムの高解像度マップに、主に依存する。このような高解像度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、第ⅠⅠ期/第ⅠⅠⅠ期の薬物試行に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高解像度マップは、ヒトゲノムにおいて、数億の公知の一塩基多型 ( SNP ) の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」は、DNAの伸張において、単一ヌクレオチド塩基において生じる一般的な変更である。例えば、SNPは、DNAの1000塩基毎に1回起こり得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連し得ない。このようなSNPの発生に基づくゲノムマップが与えられると、個体は、個々のゲノムにおいて、SNPの特定のパターンに依存して、ゲノムのカテゴリーに分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、ゲノム学的に類似の個体の間で共通であり得る特性を考慮して、このようなゲノム学的に類似の個体の群に対して変更され得る。

10

#### 【0331】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法は、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物の標的をコードする遺伝子が既知である場合 ( 例えば、本発明のMID 4460タンパク質 )、その遺伝子の全ての共通の改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョンが特定の応答に関連するか否かが決定され得る。

20

#### 【0332】

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MID 4460分子またはMID 4460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変化するか否かの指標を与え得る。

#### 【0333】

1より多い上記薬理ゲノム学アプローチから得られる情報を使用して、個体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定し得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害反応または治療不全を回避し得、それによって、MID 4460分子またはMID 4460モジュレーター ( 例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイのうちの1つによって同定されるモジュレーター ) で被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強させる。

30

#### 【0334】

本発明はさらに、本発明のMID 4460遺伝子の1つ以上によってコードされる遺伝子産物の1つ以上の活性を調節する因子の同定に基づく、新たな因子、または組み合わせを同定するための方法を提供し、ここで、これらの産物は、治療因子に対する細胞の耐性に関連し得る。詳細には、本発明のMID 4460遺伝子によってコードされるタンパク質の活性は、因子の耐性を克服するために、因子を同定するための基礎として使用され得る。耐性タンパク質の1つ以上の活性をブロックすることによって、標的細胞 ( 例えば、ヒト細胞 ) は、未改変標的細胞に耐性である因子を用いた処置に対して感受性になる。

40

#### 【0335】

MID 4460タンパク質の発現または活性に対する、因子 ( 例えば、薬物 ) の影響のモニタリングが、臨床試験において適用され得る。例えば、MID 4460遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたMID 4460活性を増加させるために、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、MID 4460遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたMID 4460活性の低下を示す被験体の臨床試験において、モニタリングされ得

50

る。あるいは、M I D 4 4 6 0 遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたM I D 4 4 6 0 活性を低下させるために、スクリーニングアッセイによって決定される因子の効果は、M I D 4 4 6 0 遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたM I D 4 4 6 0 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、M I D 4 4 6 0 遺伝子の発現または活性、好ましくは、例えば、チロシンホスファターゼ関連障害または別のM I D 4 4 6 0 関連障害に關与している他の遺伝子の発現または活性は、「読み出し (read out)」または特定の細胞の表現型のマーカーとして、使用され得る。

#### 【0336】

(他の実施形態)

別の局面において、本発明は、複数の捕捉プローブを分析する方法を特徴とする。この方法は、例えば、遺伝子発現を分析するために有用である。この方法は、以下の工程を包含する：複数のアドレスを有する2次元アレイを提供する工程であって、これら複数のアドレスの各々は、これら複数のアドレスの他の各々から、位置的に識別され得、そしてこれら複数のアドレスの各々は、独自の捕捉プローブ（例えば、核酸またはペプチド配列）を有し、ここで、該捕捉プローブは、M I D 4 4 6 0 を発現する細胞または被験体、あるいはM I D 4 4 6 0 媒介性の応答が誘発される細胞または被験体に由来する、工程；このアレイを、M I D 4 4 6 0 核酸（好ましくは精製されている）、M I D 4 4 6 0 ポリペプチド（好ましくは精製されている）または抗M I D 4 4 6 0 抗体と接触させ、それによって、これら複数の捕捉プローブを評価する工程。結合（例えば、核酸の場合、複数のアドレスのうち1つにおける捕捉プローブとのハイブリダイゼーション）は、例えば、M I D 4 4 6 0 の核酸、ポリペプチドまたは抗体に結合した標識から生じるシグナルによって、検出される。

#### 【0337】

この捕捉プローブは、選択されたサンプル（例えば、コントロールまたは刺激していない、組織または細胞由来の核酸のサンプル）由来の核酸のセットであり得る。

#### 【0338】

この方法は、M I D 4 4 6 0 の核酸、ポリペプチドまたは抗体を、複数の捕捉プローブを有する第一のアレイ、および異なる複数の捕捉プローブを有する第二のアレイと接触させる工程を包含し得る。各ハイブリダイゼーションの結果が、例えば、第一のサンプルと第二のサンプルとの間の発現の差異を分析するために、比較され得る。第一の複数の捕捉プローブは、コントロールサンプル（例えば、野生型サンプル、正常サンプル、非疾患サンプル、非刺激サンプル）（例えば、生物学的流体サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプル）由来であり得る。第二の複数の捕捉プローブは、実験サンプル（例えば、変異型サンプル、疾患状態もしくは障害状態の危険性のあるサンプル、または刺激サンプル）（例えば、生物学的流体サンプル、組織サンプルまたは細胞サンプル）由来であり得る。

#### 【0339】

複数の捕捉プローブは、複数の核酸プローブであり得、これらの各々が、M I D 4 4 6 0 の対立遺伝子と特異的にハイブリダイズする。このような方法は、被験体を診断するため、例えば、疾患もしくは障害の危険性を評価するため、被験体についての選択された処置の適切性を評価するため、被験体が疾患もしくは障害を有するか否かを評価するために、使用され得る。

#### 【0340】

この方法は、上記のように、S N Pを検出するために使用され得る。

#### 【0341】

別の局面において、本発明は、M I D 4 4 6 0 を分析する方法（例えば、構造、機能または他の核酸配列もしくはアミノ酸配列との関連を分析する方法）を特徴とする。この方法は、以下の工程：M I D 4 4 6 0 の核酸配列またはアミノ酸配列を提供する工程；M I D 4 4 6 0 配列を、好ましくは1つ以上の、配列の集合（例えば、核酸またはタンパク質の配列データベース）由来の複数の配列と比較する工程、を包含し、それによってM

10

20

30

40

50



I D 4 4 6 0 を分析する。

【 0 3 4 2 】

この方法は、M I D 4 4 6 0 配列とデータベース配列との間の配列同一性を評価する工程を包含し得る。この方法は、第二のサイト（例えば、インターネット上）にて、データベースにアクセスすることによって実施され得る。好ましいデータベースとしては、G e n B a n <sup>T M</sup> および S w i s s P r o t が挙げられる。

【 0 3 4 3 】

別の局面において、本発明は、例えば、S N P を同定するため、または M I D 4 4 6 0 の特定の対立遺伝子を同定するために有用な、オリゴヌクレオチドのセットを特徴とする。このセットは、複数のオリゴヌクレオチドを含み、その各々が、問い合わせ位置（例えば、S N P または変異部位）にて、異なるヌクレオチドを有する。好ましい実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドは、（長さが異なる以外は）互いに配列が同一である。これらのオリゴヌクレオチドは、差示的に標識され得、その結果、1つの対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、第二の対立遺伝子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドから識別され得るシグナルを提供する。

10

【 0 3 4 4 】

M I D 4 4 6 0 分子の配列は、その使用を容易にするために、種々の媒体中に提供される。配列は、単離された核酸分子またはアミノ酸分子以外の製造物として提供され得、これは、M I D 4 4 6 0 分子を含む。このような製造物は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列（例えば、オープンリーディングフレーム）を、ヌクレオチド配列もしくはアミノ酸配列またはそれらのサブセットが天然形態または精製形態で存在する場合には、それらを試験するために直接適用可能でない手段を使用する、製造物の試験を可能にする形態で、提供し得る。

20

【 0 3 4 5 】

M I D 4 4 6 0 のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、コンピュータ読出し可能な媒体に記録され得る。本明細書中で使用される場合、「コンピュータ読出し可能な媒体」は、コンピュータによって直接読み出され得、そしてアクセスされ得る、任意の媒体をいう。このような媒体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：磁気記憶媒体（例えば、フロッピー（登録商標）ディスク、ハードディスク記憶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および C D - R O M ）；電気記憶媒体（例えば、R A M 、 R O M 、 E P R O M 、 E E P R O M など）；および一般的なハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド（例えば、磁気／光学記憶媒体）。この媒体は、本発明の M I D 4 4 6 0 配列情報を有するように、適合または構成される。

30

【 0 3 4 6 】

本明細書中で使用する場合、用語「電子装置」は、データまたは情報を記憶するように構成または適合された他のデバイスの、任意の適切な計算装置または処理装置を含むことが意図される。本発明での使用に適切な電子装置の例としては、以下が挙げられる：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（L A N ）、広域ネットワーク（W A N ）インターネット、イントラネットおよびエキストラネット）；電気器具（例えば、携帯用端末（P D A ）、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。

40

【 0 3 4 7 】

本明細書中で使用される場合、「記録（記録される、記録された）」は、電子装置読出し可能媒体に、情報を記憶またはコード化するためのプロセスをいう。当業者は、既知の媒体に情報を記録するための、以前に既知の方法のいずれかを容易に適合して、M I D 4 4 6 0 配列情報を含む製造物を作成し得る。

【 0 3 4 8 】

本発明の M I D 4 4 6 0 のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が記録されたコンピュータ読出し可能媒体を作製するための種々のデータ記憶構造が、当業者に利用可能である。データ記憶構造の選択は、一般に、記憶された情報にアクセスするために選択された手

50

段に基づく。さらに、種々のデータ処置プログラムおよびフォーマットが、コンピュータ読出し可能媒体に本発明のヌクレオチド配列情報を記憶するために、使用され得る。配列情報は、文章処理テキストファイルで示され得るか、市販のソフトウェア（例えば、Word Perfect および Microsoft Word（登録商標））でフォーマットされ得るか、または ASCII ファイルの形態で示され得るか、データベースアプリケーション（例えば、DB2、Sybase、Oracle など）に保存され得る。当業者は、本発明のヌクレオチド配列情報が記録されたコンピュータ読出し可能媒体を得るために、多数のデータ処理構造フォーマット（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を容易に適合し得る。

#### 【0349】

本発明の MID 4460 のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をコンピュータ読出し可能な形態で提供することによって、当業者は、種々の目的のために配列情報に慣用的にアクセスし得る。例えば、当業者は、コンピュータ読出し可能な形態の本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を使用して、データ記憶手段内に記憶された配列情報と、標的配列または標的の構造的モチーフを比較し得る。検索を使用して、特定の標的配列または標的モチーフに一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域が同定される。

#### 【0350】

従って、本発明は、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または MID 4460 関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいはチロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の疾患または障害への素因を有するかどう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、被験体に関連する MID 4460 配列情報を決定する工程、および MID 4460 配列情報に基づいて、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の、疾患もしくは障害を有するか否かを決定する工程、そして / あるいは疾患、障害または前疾患状態についての特定の処置を推奨する工程を包含する。

#### 【0351】

本発明は、さらに、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいは MID 4460 関連の疾患または障害への素因を有するかどうかを決定するための方法を、電子システムおよび / またはネットワークにおいて提供し、ここでこの方法は、被験体に関連する MID 4460 配列情報を決定する工程、および MID 4460 配列情報に基づいて、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の、疾患もしくは障害を有するか否か、またはチロシンホスファターゼ関連もしくは別の MID 4460 関連の疾患もしくは障害への素因を有するか否かを決定する工程、そして / あるいは疾患、障害または前疾患状態についての特定の処置を推奨する工程を包含する。この方法は、被験体に関連する表現型情報を受容する工程、および / またはネットワークから被験体に関連する表現型情報を獲得する工程をさらに包含し得る。

#### 【0352】

本発明はまた、ネットワークにおいて、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいはチロシンホスファターゼ関連または MID 4460 関連の疾患または障害への素因を有するかどうかを決定するための方法を提供し、ここで、この方法は、被験体からの MID 4460 配列情報および / またはそれに関連する方法を受容する工程、この被験体に関連する表現型情報を受容する工程、ネットワークから、MID 4460 に対応する情報および / またはチロシンホスファターゼ関連もしくは別の MID 4460 関連の疾患もしくは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、MID 4460 情報（例えば、配列情報および / またはそれに関連する情報）および獲得された情報のうち 1 つ以上に基づいて、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいはチロシンホスファターゼ関連または別の MID 4460 関連の疾患または障害への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

10

20

30

40

50

は、疾患、障害または前疾患状態についての特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

【0353】

本発明はまた、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいはチロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害への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、M I D 4460に関連する情報（例えば、配列情報および/またはそれに関連する情報）を受容する工程、被験体に関連する表現型情報を受容する工程、ネットワークから、M I D 4460に関連する情報および/またはチロシンホスファターゼ関連もしくは別のM I D 4460関連の疾患もしくは障害に関連する情報を獲得する工程、ならびに表現型情報、M I D 4460情報および獲得された情報のうち1つ以上に基づいて、被験体が、チロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害を有するかどうか、あるいはチロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害への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、疾患、障害または前疾患状態についての特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

10

【0354】

本発明はまた、本発明のM I D 4460配列を含むアレイを含む。このアレイは、アレイ中に1つ以上の遺伝子の発現をアッセイするために使用され得る。1実施形態において、このアレイは、組織中の遺伝子発現をアッセイして、アレイ中の遺伝子の組織特異性を確認するために使用され得る。この様式において、約7600個までの遺伝子を、発現について同時にアッセイし得、そのうちの1つがM I D 4460であり得る。このことは、1つ以上の組織において特異的に発現される遺伝子の組を示すプロファイルが作成されることを可能にする。

20

【0355】

このような定性的情報に加えて、本発明は、遺伝子発現の定量を可能にする。従って、組織特異性だけではなく、組織中の遺伝子の組の発現レベルもまた、確認され得る。従って、遺伝子は、そ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、分類され得る。これは、例えば、その組織における遺伝子発現の関連性を確認する際に有用である。従って、1つの組織が混乱され得、第二の組織における遺伝子発現に対するその影響が決定され得る。この文脈において、生物学的刺激に応答した、別の細胞型に対する1つの細胞型の影響が決定され得る。この文脈において、生物学的刺激に応答した、別の細胞型に対する1つの細胞型の影響が決定され得る。このような決定は、例えば、遺伝子発現のレベルで、細胞-細胞相互作用の効果をj知るために有用である。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れない影響を有する場合、本発明は、所望でない影響の分子基礎を決定するためのアッセイを提供し、従って、相殺する薬剤を同時投与する機会またはそうでなければ所望でない効果を処理する機会を提供する。同様に、単一細胞型内でさえ、所望でない生物学的効果が、分子レベルで決定され得る。従って、標的遺伝子以外の遺伝子の発現に対する薬剤の影響が、確認および相殺され得る。

30

40

【0356】

別の実施形態において、このアレイは、アレイ中の1つ以上の遺伝子の発現の時間過程をモニタリングするために使用され得る。これは、本明細書中に開示されるような種々の生物学的文脈（例えば、チロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害の発症、チロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害の進行、およびチロシンホスファターゼ関連または別のM I D 4460関連の疾患または障害に関連する細胞形質転換のようなプロセス）において生じ得る。

【0357】

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の発現に対する、ある遺伝子の発現の影響を確認するため（例えば、他の遺伝子の発現に対する、M I D 44

50

60発現の影響を確認するため)に有用である。このことは、例えば、最終的な標的または下流の標的が調節され得ない場合に、治療的介入についての代替的分子標的の選択を提供する。

#### 【0358】

このアレイはまた、正常細胞および異常細胞における1つ以上の遺伝子の差示的発現パターンを確認するために有用である。このことは、診断または治療的介入のための分子標的として作用し得る遺伝子の組(例えば、M I D 4460を含む)を提供する。

#### 【0359】

本明細書中で使用する場合、「標的配列」は、6個以上のヌクレオチドの任意のDNA配列または2個以上のアミノ酸の任意のアミノ酸配列であり得る。当業者は、標的配列が長くなるほど、標的配列がデータベース中のランダムな存在として存在する可能性が低くなることを、容易に認識し得る。標的配列の代表的な長さは、約10~100アミノ酸、または約30~300ヌクレオチド残基である。しかし、商業的に重要なフラグメント(例えば、遺伝子発現およびタンパク質プロセッシングに關与する配列フラグメント)は、より短い長さのものであり得ることが、充分認識される。

#### 【0360】

分析および他の配列との比較のために、コンピュータ読出し可能な媒体中に提供される配列情報に、当業者がアクセスすることを可能にするコンピュータソフトウェアが、公に利用可能である。種々の公知のアルゴリズムが公に公開されており、そして検索手段を実行するための種々の市販のソフトウェアが、本発明のコンピュータベースのシステムにおいて使用され得る。このようなソフトウェアの例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: Mac Pattern (EMBL)、BLASTNおよびBLASTX (NCBI)。

#### 【0361】

従って、本発明は、コンピュータ読出し可能なマトリクスに配列を記録する工程を包含する、M I D 4460配列のコンピュータ読出し可能な配列の記録を作成する方法を特徴とする。好ましい実施形態において、この記録は、以下のうちの1つ以上を含む: ORFの同定; ドメイン、領域または部位の同定; 転写開始の同定; 転写ターミネーターの同定; タンパク質またはその成熟形態の全長アミノ酸配列; 翻訳領域の5'末端。

#### 【0362】

別の局面において、本発明は、配列を分析する方法を特徴とする。この方法は、以下の: コンピュータ読出し可能な形態で、M I D 4460配列または記録を提供する工程; このM I D 4460配列に対して第二の配列を比較する工程を包含し、それによって、配列を分析する。比較は、配列の正体について配列と比較する工程、または1つの配列が他の配列内に含まれるか否かを決定する工程(例えば、M I D 4460配列が、比較される配列に含まれるか否かを決定する工程)を包含し得る。好ましい実施形態において、M I D 4460配列または第二の配列は、第一のコンピュータ(例えば、第一のサイト)に記憶され、そしてこの比較は、第二のコンピュータ(例えば、第二のサイト)で実施されるか、読み出されるか、または記録される。例えば、M I D 4460配列または第二の配列は、公に記憶され得るか、または1つのコンピュータ中の専有データベース中に記憶され得、そして比較の結果は、第二のコンピュータで実施されるか、読み出されるか、または記録される。好ましい実施形態において、記録は、以下のうちの1つ以上を含む: ORFの同定; ドメイン、領域または部位の同定; 転写開始の同定; 転写ターミネーターの同定; タンパク質またはその成熟形態の全長アミノ酸配列; 翻訳領域の5'末端。

#### 【0363】

本発明は、以下の実験によってさらに例示され、これらは、限定として解釈されるべきではない。

#### 【0364】

(実験)

(遺伝子発現分析)

10

20

30

40

50

総RNAを、製造業者 (TelTest, Inc.) の指示に従ってRNA STAT-60を使用して、単一工程の抽出によって、種々のヒト組織から調製した。各RNA調製物を、37 で1時間にわたって、DNase I (Ambion) で処理した。内部アンプリコン参照として - 2ミクログロブリンを使用して、蛍光の閾値レベルに到達するために、サンプルが少なくとも38サイクルのPCR増幅を必要とした場合に、DNase I処理が完了したと決定した。DNase I処理後のRNAサンプルの完全性を、アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色によって確認した。フェノール抽出後、cDNAを、製造業者 (GibcoBRL) の指示に従ってSuperScript<sup>TM</sup> Choice Systemを使用して、サンプルから調製した。逆転写酵素を有さないネガティブコントロールのRNAが、各RNAサンプルについての逆転写されたモックであった。

10

#### 【0365】

ヒトMID 4460発現を、種々の正常および疾患 (例えば、癌性の) ヒト組織または細胞株から調製されたcDNAにおいて、TaqMan (登録商標) 定量的PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems) によって測定した。

#### 【0366】

プローブを、ヒトMID 4460遺伝子の配列に基づいて、PrimerExpressソフトウェア (PE Biosystems) によって設計した。各ヒトMID 4460遺伝子プローブを、FAM (6-カルボキシフルオレセイン) を使用して標識し、そして 2-ミクログロブリン参照プローブを、異なる蛍光色素VICで標識した。従って、標的遺伝子および内部参照遺伝子の差示的標識化は、同じウェル中での測定を可能にした。2-ミクログロブリンおよび標的遺伝子の両方についての順方向および逆方向のプライマーおよびプローブを、TaqMan (登録商標) Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) に添加した。プライマーおよびプローブの最終濃度は異なり得るが、各々が、所定の実験内では内的に一貫していた。代表的な実験は、200 nMの順方向および逆方向のプライマー + - 2ミクログロブリンについてのプローブ100 nM、ならびに600 nMの順方向および逆方向のプライマー + 標的遺伝子についてのプローブ200 nMを含んだ。TaqManマトリックス実験を、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) で実施した。サーマルサイクラーの条件は、以下の通りであった：50 で2分間、そして95 で10分間維持、次いで (95 で15秒間次いで60 で1分間) × 40サイクルの、2工程PCR。

20

30

#### 【0367】

以下の方法を使用して、同じ組織中の - 2ミクログロブリン発現と比較して、種々の組織においてヒトMID 4460遺伝子の発現を定量的に計算した。閾値サイクル (Ct) 値を、蛍光における統計的に有意な増加が検出されるサイクルとして定義する。より低いCt値は、より高いmRNA濃度を示す。ヒトMID 4460遺伝子のCt値を、- 2ミクログロブリン遺伝子のCt値を差し引くことによって正規化し、以下の式を使用してCt値を得る： $Ct = Ct_{ヒト59914} および 59921 - Ct_{-2ミクログロブリン}$ 。次いで、発現を、比較的低いレベルのヒトMID 4460遺伝子の発現を示すcDNAサンプルに対して校正する。次いで、標準サンプルについてのCt値を、以下の式に従って、各組織サンプルについてのCtから差し引く： $Ct = Ct_{サンプル} - Ct_{標準}$ 。次いで、相対的な発現を、 $2^{-Ct}$  によって与えられる演算式を使用して校正する。次いで、試験した各組織中の標的ヒトMID 4460遺伝子の発現を、以下により詳細に考察されるように、グラフにより示す。

40

#### 【0368】

これらの結果は、心臓、脾臓、脳、結腸、肝臓、脾臓および小腸における有意なMID 4460の発現を示す (以下の表を参照のこと)。

#### 【0369】

50

【表 1】

フェーズ 1.4.3 $\beta$ 2 に対する 4460. 1 の発現	
組織	発現
動脈, 正常	0.165
静脈, 正常	0
大動脈 SMC 初期	0.8327
冠状 SMC	1.1694
静止 HUVEC	0.1216
剪断 (Shear) HUVEC	0.4766
心臓, 正常	3.3538
心臓, CHF	0.5609
腎臓	0.2155
骨格筋	0.1524

【 0 3 7 0 】

脂肪、正常	0.0554
脾臓	4.03
初代骨芽細胞	0
破骨細胞 (diff.)	0
皮膚、正常	0.0837
脊髄、正常	6.9441
脳、皮質 正常	7.0167
脳、視床下部	5.9208
神経	0.0845
DRG (後根神経節)	1.9196
静止 PBMC	0
グリア芽細胞腫	0.2728
乳房、正常	0.6288
乳房、腫瘍	0.2125
卵巣、正常	0.4832
卵巣、腫瘍	0.1078
前立腺、正常	0.1393
前立腺、腫瘍	0.2358
上皮細胞(前立腺)	1.0251
結腸、正常	14.885
結腸、腫瘍	24.7745
肺、正常	0.0242
肺、腫瘍	4.0721
肺、COPD	0.0517
結腸、IBD	12.5602
肝臓、正常	5.6796
肝臓、線維症	9.585
真皮細胞-繊維芽細胞	0.1139
脾臓、正常	6.8723
扁桃、正常	0.0236
リンパ節	0.0135
小腸	4.8426
皮膚、褥瘡	0
滑膜	0.1336
BM-MNC (骨髄)	0.0027
活性化 PBMC	0

10

20

30

ヒト肝臓パネルにおける4460. 1発現	
組織	発現
PIT 278/心臓	10.0616
PIT 351/腎臓	0.6647
PIT 915/骨格筋	0.7769
NDR 63/肝臓/正常	17.9484
NDR 242/肝臓/正常	8.0321
PIT 260/肝臓/正常	9.8545
CHT 756/肝臓/正常	7.9491
MPI 146/肝臓/正常	11.164
CHT 902/肝臓/正常	6.6843

40

CHT 1679/肝臓/正常	5.9826
CHT 1420/肝臓/正常	9.0054
CHT 339/肝臓/正常	7.6783
CHT 1237/肝臓/正常	3.6447
PIT 45/肝臓/罹患	10.0268
PIT 292/肝臓/罹患	22.8763
CLN 784/肝臓/罹患	3.9608
NDR 752/肝臓/罹患	11.0103

## 【 0 3 7 2 】

本願を通じて引用される全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は、本明細書中で参考として援用される。 10

## 【 0 3 7 3 】

(等価物)

当業者は、慣用的にすぎない実験を使用して、本明細書中に記載される発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するかまたは確認し得る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 3 7 4 】

【図 1 a】図 1 a は、ヒト M I D 4 4 6 0 の c D N A 配列 (配列番号 1) および推定アミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。メチオニンで開始するヒト M I D 4 4 6 0 のオープンリーディングフレーム (配列番号 1 の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域を除く) もまた、コード配列 (配列番号 3) として示す。シグナル配列が切断された成熟タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号 4 として示す。 20

【図 1 b】図 1 b は、ヒト M I D 4 4 6 0 の c D N A 配列 (配列番号 1) および推定アミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。メチオニンで開始するヒト M I D 4 4 6 0 のオープンリーディングフレーム (配列番号 1 の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域を除く) もまた、コード配列 (配列番号 3) として示す。シグナル配列が切断された成熟タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号 4 として示す。

【図 1 c】図 1 c は、ヒト M I D 4 4 6 0 の c D N A 配列 (配列番号 1) および推定アミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。メチオニンで開始するヒト M I D 4 4 6 0 のオープンリーディングフレーム (配列番号 1 の 5' 側および 3' 側の非翻訳領域を除く) もまた、コード配列 (配列番号 3) として示す。シグナル配列が切断された成熟タンパク質のアミノ酸配列を、配列番号 4 として示す。 30

【図 2】図 2 は、ヒト M I D 4 4 6 0 のヒドロパシープロットを示す。相対的に疎水性の残基を、水平点線の上に示し、そして相対的に親水性の残基を、水平点線の下に示す。システイン残基 (c y s) を、ヒドロパシートレースの直ぐ下の短い垂線により示す。ヒト M I D 4 4 6 0 のアミノ酸配列に対応する数を示す。本発明のポリペプチドは、以下を含むフラグメントを含む：疎水性配列の全てまたは一部分 (例えば、点線上の配列 (例えば、配列番号 2 のおよそアミノ酸 1 ~ 25、およそアミノ酸 85 ~ 100、およそアミノ酸 355 ~ 365、およそアミノ酸 710 ~ 720 配列、およそアミノ酸 750 ~ 775、およびおよそアミノ酸 1020 ~ 1040 の配列)) ; 親水性配列の全てまたは一部分 (例えば、点線の下に配列 (例えば、配列番号 2 のおよそアミノ酸 65 ~ 85、およそアミノ酸 140 ~ 175、およそアミノ酸 190 ~ 225、およそアミノ酸 230 ~ 240、およそアミノ酸 250 ~ 265、およそアミノ酸 315 ~ 350、およそアミノ酸 365 ~ 395、およそアミノ酸 402 ~ 422、およそアミノ酸 420 ~ 435、およそアミノ酸 450 ~ 470、およそアミノ酸 480 ~ 488、およそアミノ酸 495 ~ 505、およそアミノ酸 510 ~ 525、およそアミノ酸 540 ~ 558、およそアミノ酸 561 ~ 580、およそアミノ酸 595 ~ 630、およそアミノ酸 700 ~ 715、およそアミノ酸 773 ~ 790、およそアミノ酸 800 ~ 818、およそアミノ酸 835 ~ 855、およそアミノ酸 921 ~ 945、およそアミノ酸 995 ~ 1015、およびおよそアミノ酸 1075 ~ 1118 の配列)) ; C y s またはグリコシル化部位を含む配列。 40 50





【 図 1 c 】

TTGAGCCCGGAACCTTGTACACATTCTCTATN99SCAGAAAAAATGAGCACCTG9CT  
 CCAGCGAATGTTCAGATCTCCACGTGCCCAACGAGGTGACAGACCTCAGCAAGCAGG  
 ACTGAGCAACACACACCATTCCTTTGCGCTTGACAGCTCCCGAGG9CCACG9CAGTCTT  
 CCTACAGCTACTGGGTCTCATTTGGGTGAGGAGGCACTGACGCCACGAG9CCAAAGCA  
 CCTCAGGTACTGACATCACCTTAAAGGAATGGAAGCTGGCAGCTGTACACCTCACCG  
 TCTGGGCGGAGGAATGAGTCAAGAGCTATAACAGCACCTCATGTCAGCCACTGCTC  
 CCAATGAGGTACAGATCTCCAGAA7GAAATCAGACTAGAACTCAGTCAITGCTGTG9T  
 GGAAG9CCCTTGAGAGCCCCACCTTCAGTT9TACGTATATCTGG9TCCAGTGG9CAGGA  
 AG9ACATCCCGGAGG9GCAAGTCCCAAG9GAATTTGGGTAAACAGACACAGCAGGA  
 CCAATGAGACGTGTGCAAAAGTGGAG9CCCTGGAACCCGG9ACGTTGTACAAATTTACCG  
 TGTGG9CAGAGAGGAATGACGTAGCCAGTTCCACGACAGAGCCTCTGTG9CTCAATACC  
 CAGACACAGTACCATCACTTCTCTGTGTGACAGCTCAGCGGCTGTG9GTCACATACC  
 TCTGTCTCTGCCCCAGG9AG9CTACAGG9CTTTGA9TTGGAGGTGGAG9ACAGCGG  
 GCTCCAGGACAGATCTTCATGTGG9AG9CTGTGTCTGTGTGTGG9TCTCGGCGG9CTC  
 G9TCTACACAGCACCATCAGACCATCTGG9AG9AATGAG9TCTGTCTCACTCTG  
 T9TCTCTCCACACCGAGGTCTCAGG9CTCATTTGCGGAG9CTTTGTGG9CATCTCTCTGT  
 TTCTCTCTCTGTG9G9CTGTCTGATTTTCTCTCTGAAGAGG9GAATAGAAAGACAGC  
 AGAAACAGAACTCAGG9ATCTG9TCTTTAGCTCCCGAGG9GACATCCAGCTGAAGACT  
 TCGTGAACACGTCAAG9AATGAGAGG9ACAGCAACTGTG9TTTTCAGACAG9TACC  
 AGCAACTCTCCCTG9TGG9CCACAG9AGTCTCAGATG9TGGCTTCG9CTCAGAGAAACA  
 AC9CAGAGAAC9CTACAGAAATGTCTTGCCTATGACTG9TCCG9GTCCCTGAAGC  
 C9HCCATGAG9G9CAG9CTCTGACTACATCAATG9CAGCTTCA9TCCG9TCTCTGGA  
 G9CC9CAGGAGTTCAITTC9AA9CAG99TCCCTG9CAGACAGTGG9TGACTTCTTGGC  
 G9CTG9TGTGG9AACAGCAGAG9CACAC9CTG9TCACTG9CA9CACTG9CATGG9G9C  
 G9CG9GTGAAGTGTGAGCATTACTGG9CTCTG9ACTG9CAG9CTG9AC9CATGG9CACC  
 TCG9GTAA9CTGTG9TGTG9GAAGTGTG9GA9ACTG9AC9GTG9G9G9ACTG9CTG9  
 TCTCTCAGGTGGAG9CAGAG9ACTGTCTG9C9CAATTC9ACTAC9G9CTG9C  
 G9ATCAG9G9TCTCTCTCTCC9CAGACACTG9CTG9CTTTCTG9AG9TGTCTG9C  
 AGTGTGTG9ATCAG9ACCATG9AG9G9G9CCAC9CATTTG9CAGTCA9G9T9CTG9G9  
 GTG9CAG9AA9CTCATTTG9CCTG9ACTG9CTG9CTG9G9CAG9TCA9TCCAG9G9T  
 TCTTTGG9CCTTCA9CTTTGTAA9GAAGTGA9AG9AG9TGG9CGTTG9TGTG9CAG9  
 CTG9G9CTG9TAC9TATCTG9C9TCA9GTCA9CTG9CG9TCTCTCA9CAG9TCA9CC9  
 G9CC9CAG9CAG9AG9AG9TCC9GTATG9AG9ATG9C9AA9ACCTCATCTAC9G9AAC9T  
 G9CC9G9CATCAG9CC9CAAG9TGTG9G9TCTAAG9TGA

#### MID 4460 の成熟形態のアミ/酸配列 (配列番号4)

RAPAPNPRNLTVETQTTSSISLSW9VDPGLDSQNSVWV9CTGG9TTE9NTAT9VT  
 VDGL9PGL9LYTCSVW9EK9GVNS9V9T9TATAPN9P9N9L9R9V9EAQ9TNS9IAL9T9E9V9DP9P  
 DP9NST9Y9VE9Y9T9G9G9R9AG9T9R9TA9T9N9IT9VD9LE9P9CL9Y9AF9SM9W9G9K9G9INS9R9E9TR9N9AT  
 TAPN9P9R9K9P9E9GG9DH9QL9HL9P9EL9G9P9R9W9R9P9TEL9DL9R9T9S9AL9E9VA9E9QL9ET9QT9P9E9F9V  
 D9L9R9GL9LYTCSVW9EK9GVNS9W9L9Y9T9TAPN9P9N9L9TV9EAQ9TNS9IAL9T9E9V9DP9P  
 DP9NST9Y9VE9Y9T9G9G9R9AG9T9R9TA9T9N9IT9VD9LE9P9CL9Y9F9SVW9G9K9G9INS9R9E9TR9N9AT  
 TAPN9P9N9L9H9M9ET9Q9TNS9IAL9C9W9R9V9DP9P9Q9DY9Y9W9GY9T9G9G9GT9E9R9NT9NT9SV9T9AE  
 R9LE9P9GL9Y9TF9V9W9A9R9G9R9G9R9Q9N9V9L9TV9P9N9AT9SL9K9Q9D9W9N9ST9IAL9R9W9T9AP9G9P9G9Q  
 S9Y9TW9G9W9R9E9M9T9R9T9Q9T9S9G9T9IT9L9K9L9E9AS9IX9L9TW9A9R9N9V9G9Y9N9ST9L9A9AT  
 APN9E9V9IDL9Q9N9ET9Q9T9N9SV9L9M9K9AP9G9PH9SQ9LY9Y9W9Q9W9AS9KH9P9R9G9Q9P9Q9AN9W9N9Q9T9S  
 R9N9E9W9Y9K9V9E9AL9E9P9GL9Y9N9FT9W9A9R9ND9V9AS9T9Q9SL9CA9ST9Y9P9D9V9T9ITS9CV9TS9AG9Y9GV9N  
 L9W9SC9P9Q9GY9E9AF9LE9V9G9Q9R9G9S9Q9R9S9C9E9AV9SL9G9I9G9R9S9T9PAT9IT9T9W9D9M9Y9V9SH  
 S9V9CH9R9E9AG9T9L9Q9P9F9C9ILL9FL9L9V9LL9L9P9K9R9K9K9Q9K9P9L9D9L9V9S9P9SD9P9AE  
 D9AD9H9R9K9N9ER9D9NC9F9AD9E9Y9Q9SL9V9H9S9Q9M9V9AS9A9EN9NA9K9N9Y9R9N9L9P9W9SR9V9L  
 K9I9H9R9P9G9SD9Y9IN9AS9F9P9GL9W9SP9Q9E9I9AT9G9P9L9Q9T9V9D9F9W9RL9W9EQ9SH9TL9V9L9T9N9C9M9E  
 A9R9V9K9C9H9Y9W9FL9D9SQ9CT9H9GL9R9V9TL9V9E9V9M9N9W9T9R9ELL9LL9Q9VE9EQ9T9L9SV9R9Q9PHY9QA  
 W9F9G9V9SS9P9D9TL9A9F9W9R9L9Q9L9Q9T9N9E9G9E9Y9T9H9S9G9V9R9T9L9AL9D9L9L9Q9L9Q9S9E  
 GL9G9P9P9SF9R9K9M9R9E9R9PL9M9Q9T9E9AQ9Y9V9L9H9Q9IC9G9S9N9Q9P9R9Q9P9R9K9S9R9M9R9S9K9T9S9TR  
 T9W9P9P9R9P9T9W9R9SK

FIGURE 1C

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



PCT

**WO 03/025199 A2**

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

ticals, Inc., 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, GR, HK, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, LU, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PK, 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.

GM, IIR, IJU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

EK, ER, ES, LI, 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.

SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

European patent (AI, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*[Continued on next page]*

**(54) Title:** MID 4460, A HUMAN TYROSINE PHOSPHATASE FAMILY MEMBER AND USES THEREFOR

cDNA Sequence of MID 4460 (SEQ ID NO:1)

[illegible]

**(57) Abstract:** The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated MID 4460 nucleic acid molecules, which encode novel tyrosine phosphatase family members. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing MID 4460 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and nonhuman transgenic animals in which a MID 4460 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated MID 4460 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-MID 4460 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilize compositions of the invention are also provided.

**(57) Abstract:** The invention provides isolated nucleic acids molecules, designated MID 4460 nucleic acid molecules, which encode novel tyrosine phosphatase family members. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing MID 4460 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and nonhuman transgenic animals in which a MID 4460 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated MID 4460 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-MID 4460 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilize compositions of the invention are also provided.

---

**WO 03/025199 A2** **Published:**

— without international search report and to be republished  
upon receipt of that report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 03/025199

PCT/US02/29353

**MID 4460, A HUMAN TYROSINE PHOSPHATASE FAMILY MEMBER  
AND USES THEREFOR**

**Related Applications**

[0001] This application claims priority to U.S. provisional application number 60/323,018, filed on September 18, 2001, the contents of which are incorporated herein by reference.

**Background of the Invention**

[0002] Phosphate tightly associated with protein has been known since the late nineteenth century. Since then, a variety of covalent linkages of phosphate to proteins have been found. The most common involve esterification of phosphate to serine and threonine, with smaller amounts being covalently linked to lysine, arginine, histidine, aspartic acid, glutamic acid, and cysteine. The occurrence of phosphorylated proteins implies the existence of one or more protein kinases capable of phosphorylating amino acid residues on proteins, and also of protein phosphatases capable of hydrolyzing phosphorylated amino acid residues on proteins.

[0003] Protein kinases play critical roles in the regulation of biochemical and morphological changes associated with cellular growth and division (D'Urso, G. *et al.* (1990) *Science* 250: 786-791; Birchmeier, C. *et al.* (1993) *Bioessays* 15: 185-189). They serve as growth factor receptors and signal transducers and have been implicated in cellular transformation and malignancy (Hunter, T. *et al.* (1992) *Cell* 70: 375-387; Posada, J. *et al.* (1992) *Mol. Biol. Cell* 3: 583-592; Hunter, T. *et al.* (1994) *Cell* 79: 573-582). For example, protein kinases have been shown to participate in the transmission of signals from growth-factor receptors (Sturgill, T. W. *et al.* (1988) *Nature* 344: 715-718; Gomez, N. *et al.* (1991) *Nature* 353: 170-173), control of entry of cells into mitosis (Nurse, P. (1990) *Nature* 344: 503-508; Maller, J. L. (1991) *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 269-275) and regulation of actin bundling (Husain-Chishti, A. *et al.* (1988) *Nature* 334: 718-721).

[0004] The overall level, in cells, of protein tyrosine phosphorylation, as well as the phosphorylated state of any given protein, arises from the balance of Protein Tyrosine Kinase (PTK) and Protein Tyrosine Phosphatase (PTPase) activities. Thus PTPases have been proposed as key regulatory elements of cell growth control (Hunter, 1989, *Cell* 58:1013-1016).

WO 03/025199

PCT/US02/29353

**[0005]** PTKs were discovered and characterized more than one decade earlier than PTPases and in the last few years a large number of studies has led to the identification of many new PTPases and some of them have been accurately characterized. In addition, findings on the biological role of some PTPases in cells have recently been reported (Pondaven, 1991, *Adv Prot Phosphatases* 6:35-57). Current work suggests that PTKs and PTPases are equally important in many biological processes ranging from cell growth control to cell differentiation and development. In particular, the oncogenic potential of PTKs and the ability of PTPases to counteract PTK oncogenic activation by antiproliferative action suggests that the genes coding for PTPases, in many instances, may be considered tumor-suppressing genes or even anti-oncogenes

**[0006]** The existence of PTPases was first predicted to explain the rapid loss of phosphorylation of *in vitro* phosphorylated membrane proteins (Carpenter et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254:4884-4891). The main PTPase in human placenta (PTP1B) was purified to homogeneity and sequenced (Tonks et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263:6722-2730; Charbonneau et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5252-5256). Sequence homology between the catalytic domain of PTP1B and the leukocyte common antigen (LCA, or CD45) was demonstrated, indicating that PTPases can be considered a family of structurally related molecules.

**[0007]** The effects of many growth factors such as NGF, BDNF, NT3, FGF, insulin and IGF1 are known to be mediated by high-affinity receptors with tyrosine kinases activity (Fantl et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 62 (1993) 453-481; Schlessinger and Ulrich *Neuron*, 9 (1992) 383-391; Ullrich and Schlessinger *Cell*, 61 (1990) 203-212). Expression of several tyrosine phosphatase genes has been detected in the brain (Jones et al. *J. Biol. Chem.*, 264 (1989) 7747-7753), including *RPTPα* (Kaplan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 91990) 7000-7004; Sap et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1990) 6112-6116), *RNPTPX* (Guan et al. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (19910) 1501-1505), *STEP* (Lombroso et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (1991) 7242-7246), *SH-PTP2* (Freeman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 11239-11243), *MPTP8* (Mizuno et al. *Mol. Cell. Biol.*, 13 (1993) 5513-5523), *DPTP99A* and *DPTP10D* (Yang et al. *Cell*, 67 (1991) 661-673).

**[0008]** Intraventricular administration of either NGF, BDNF, insulin or IGF1 prevents delayed neuronal death in the CA1 subfield of the hippocampus (Beck et al. *J. Cereb Blood Flow Metab.*, 14 (1994) 689-692; Shigeno et al. *J. Neurosci.*, 11 (1991) 2914-2919; Zhu and Auer *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14 (1994) 237-242).

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[0009] Tyrosine kinase inhibitors block the tyrosine phosphorylation of MAP kinase (Blenis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 5889-5892; Pelech and Sanghera *Science*, 257 (1992) 1335-1356) and prevent delayed neuronal death after forebrain ischemia (Kindy *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13 (1993) 372-377). During reperfusion after ischemia, tyrosine phosphorylation of proteins increases in the hippocampus but some proteins in the hippocampus are dephosphorylated (Campos-Gonzalez *J. Neurochem.*, 59 (1992) 1955-1958; Hu and Wieloch *J. Neurochem.*, 62 (1994) 1357-1367; Takano *et al.* *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15 (1995) 33-41). These observations suggest that tyrosine phosphorylation plays an important role in the delayed neuronal death which occurs as a result of ischemia-reperfusion injury.

[0010] A number of PTPases, in addition to the hydrolytic activity on phosphotyrosine, show some phosphoserine/phosphothreonine phosphatase activity. These enzymes, mostly localized in the nucleus and referred to as dual-specificity PTPases (dsPTPases), are emerging as a subclass of PTPases acting as important regulators of cell cycle control and mitogenic signal transduction possibly by controlling the activity of signal transduction proteins like ERK. In fact, they appear responsible for *in vivo* nuclear dephosphorylation and inactivation of nuclear dephosphorylation and inactivation of MAP kinases (Alessi *et al.*, 1995, *Curr Biol* 5:195-283). These enzymes exhibit sequence identity to the vaccinia H-1 gene product, the first identified dsPTPase (Guan *et al.*, 1991, *Nature* 350:359-362). Several dsPTPases differing from each other in length have been identified. These enzymes and the other PTPase subclasses share an active site sequence motif showing only a limited sequence homology beyond this region.

[0011] Given the importance of such protein tyrosine phosphatases in the regulation of the cell cycle, there exists a need to identify novel protein tyrosine phosphatases which function as modulators in the cell cycle such as the suppression of proliferation and whose aberrant function can result in disorders arising from improper cell cycle regulation such as cancer.

#### Summary of the Invention

[0012] The present invention is based, in part, on the discovery of a novel tyrosine phosphatase family member, referred to herein as "MID 4460". The nucleotide sequence of a cDNA encoding MID 4460 is shown in SEQ ID NO:1, and the amino acid sequence of a

WO 03/025199

PCT/US02/29353

MID 4460 polypeptide is shown in SEQ ID NO:2. In addition, the nucleotide sequence of the coding region is depicted in SEQ ID NO:3.

**[0013]** Accordingly, in one aspect, the invention features a nucleic acid molecule which encodes a MID 4460 protein or polypeptide, *e.g.*, a biologically active portion of the MID 4460 protein. In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule encodes a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. In other embodiments, the invention provides isolated MID 4460 nucleic acid molecules having the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In still other embodiments, the invention provides nucleic acid molecules that are substantially identical (*e.g.*, naturally occurring allelic variants) to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In other embodiments, the invention provides a nucleic acid molecule which hybridizes under a stringent hybridization condition as described herein to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, wherein the nucleic acid encodes a full length MID 4460 protein or an active fragment thereof.

**[0014]** In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include a MID 4460 nucleic acid molecule described herein. In certain embodiments, the nucleic acid molecules of the invention are operatively linked to native or heterologous regulatory sequences. Also included are vectors and host cells containing the MID 4460 nucleic acid molecules of the invention *e.g.*, vectors and host cells suitable for producing polypeptides.

**[0015]** In another related aspect, the invention provides nucleic acid fragments suitable as primers or hybridization probes for the detection of MID 4460-encoding nucleic acids.

**[0016]** In still another related aspect, isolated nucleic acid molecules that are antisense to a MID 4460 encoding nucleic acid molecule are provided.

**[0017]** In another aspect, the invention features MID 4460 polypeptides, and biologically active or antigenic fragments thereof that are useful, *e.g.*, as reagents or targets in assays applicable to treatment and diagnosis of tyrosine phosphatase-associated or other MID 4460-associated disorders. In another embodiment, the invention provides MID 4460 polypeptides having a MID 4460 activity. Preferred polypeptides are MID 4460 proteins including at least one tyrosine phosphatase domain, and, preferably, having a MID 4460 activity, *e.g.*, a MID 4460 activity as described herein.

**[0018]** In other embodiments, the invention provides MID 4460 polypeptides, *e.g.*, a MID 4460 polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2; or



WO 03/025199

PCT/US02/29353

an amino acid sequence encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence which hybridizes under a stringent hybridization condition as described herein to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, wherein the nucleic acid encodes a full length MID 4460 protein or an active fragment thereof.

[0019] In a related aspect, the invention further provides nucleic acid constructs which include a MID 4460 nucleic acid molecule described herein.

[0020] In a related aspect, the invention provides MID 4460 polypeptides or fragments operatively linked to non-MID 4460 polypeptides to form fusion proteins.

[0021] In another aspect, the invention features antibodies and antigen-binding fragments thereof, that react with, or more preferably specifically or selectively bind MID 4460 polypeptides.

[0022] In another aspect, the invention provides methods of screening for compounds that modulate the expression or activity of the MID 4460 polypeptides or nucleic acids.

[0023] In still another aspect, the invention provides a process for modulating MID 4460 polypeptide or nucleic acid expression or activity, *e.g.*, using the compounds identified in the screens described herein. In certain embodiments, the methods involve treatment of conditions related to aberrant activity or expression of the MID 4460 polypeptides or nucleic acids, such as conditions or disorders involving aberrant or deficient tyrosine phosphatase function or expression. Examples of such disorders include, but are not limited to, cardiovascular disorders including, but not limited to, hypercholesterolemia and atherosclerosis, and liver disorders.

[0024] The invention also provides assays for determining the activity of or the presence or absence of MID 4460 polypeptides or nucleic acid molecules in a biological sample, including for disease diagnosis.

[0025] In a further aspect, the invention provides assays for determining the presence or absence of a genetic alteration in a MID 4460 polypeptide or nucleic acid molecule, including for disease diagnosis.

[0026] In another aspect, the invention features a two dimensional array having a plurality of addresses, each address of the plurality being positionally distinguishable from each other address of the plurality, and each address of the plurality having a unique capture probe, *e.g.*, a nucleic acid or peptide sequence. At least one address of the plurality has a capture probe that recognizes a MID 4460 molecule. In one embodiment, the capture probe is a nucleic acid, *e.g.*, a probe complementary to a MID 4460 nucleic acid sequence. In

WO 03/025199

PCT/US02/29353

another embodiment, the capture probe is a polypeptide, *e.g.*, an antibody specific for MID 4460 polypeptides. Also featured is a method of analyzing a sample by contacting the sample to the aforementioned array and detecting binding of the sample to the array.

[0027] Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

#### **Brief Description of the Drawings**

[0028] *Figure 1a-c* depicts a cDNA sequence (SEQ ID NO:1) and predicted amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of human MID 4460. The methionine-initiated open reading frame of human MID 4460 (without the 5' and 3' untranslated regions of SEQ ID NO:1) is shown also as the coding sequence, SEQ ID NO:3. The amino acid sequence of the mature protein with the signal sequence cleaved is shown as SEQ ID NO:4.

[0029] *Figure 2* depicts a hydropathy plot of human MID 4460. Relatively hydrophobic residues are shown above the dashed horizontal line, and relatively hydrophilic residues are below the dashed horizontal line. The cysteine residues (cys) are indicated by short vertical lines just below the hydropathy trace. The numbers corresponding to the amino acid sequence of human MID 4460 are indicated. Polypeptides of the invention include fragments which include: all or part of a hydrophobic sequence, *e.g.*, a sequence above the dashed line, *e.g.*, the sequence from about amino acid 1 to 25, from about 85 to 100, from about 355 to 365, from about 710 to 720, from about 750 to 775, and from about 1020 to 1040 of SEQ ID NO:2; all or part of a hydrophilic sequence, *e.g.*, a sequence below the dashed line, *e.g.*, the sequence from about amino acid 65 to 85, from about 140 to 175, from about 190 to 225, from about 230 to 240, from about 250 to 265, from about 315 to 350, from about 365 to 395, from about 402 to 422, from about 420 to 435, from about 450 to 470, from about 480 to 488, from about 495 to 505, from about 510 to 525, from about 540 to 558, from about 561 to 580, from about 595 to 630, from about 700 to 715, from about 773 to 790, from about 800 to 818, from about 835 to 855, from about 921 to 945, from about 995 to 1015, and from about 1075 to 1118 of SEQ ID NO:2; a sequence which includes a Cys, or a glycosylation site.

[0030] *Figure 3a-b* depicts an alignment of the tyrosine phosphatase domain of human MID 4460 with a consensus amino acid sequence derived from a hidden Markov model (HMM) from PFAM. The upper sequence is the consensus amino acid sequence (SEQ ID NO:X), while the lower amino acid sequence corresponds to amino acids 846 to 1080 of SEQ ID NO:2.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[0031] Figure 4 depicts a BLAST alignment of the human MID 4460 tyrosine phosphatase domain with a consensus amino acid sequence of a domain derived from the ProDomain database ("Full Name of Prodom description;" No. PD312226; ProDomain Release 2001.1; <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>). The lower sequence is amino acid residues 1 to 217 of the 217 amino acid PD312226 consensus sequence (SEQ ID NO:X), while the upper amino acid sequence corresponds to the tyrosine phosphatase domain of human MID 4460, amino acid residues 540 to 756 of SEQ ID NO:2. The BLAST algorithm identifies multiple local alignments between the consensus amino acid sequence and human MID 4460.

[0032] Figures 5a-b depict a GAP alignment of human MID 4460 with protein-tyrosine phosphatase (EC 3.1.3.48), receptor type H precursor (SAP-1; D15049 in Genbank). The lower sequence in the figure is amino acids 1 to 1118 of human MID 4460 (SEQ ID NO:2) while the upper sequence is amino acids 42 to 3395 of D15049 (SEQ ID NO:X). GAP alignments use a matrix made by matblas from blosum62.ij.

#### Detailed Description of the Invention

[0033] The human MID 4460 sequence (Figure 1a; SEQ ID NO:1), which is approximately 3900 nucleotides long including untranslated regions, contains a predicted methionine-initiated coding sequence of about 3357 nucleotides, including the termination codon (nucleotides indicated as coding of SEQ ID NO:1 in Fig. 1a-c; SEQ ID NO:3). The coding sequence encodes a 1118 amino acid protein (SEQ ID NO:2). The human MID 4460 protein of SEQ ID NO:2 and Figure 2 includes an amino-terminal hydrophobic amino acid sequence, consistent with a signal sequence, of about 25 amino acids (from amino acid 1 to about amino acid 25 of SEQ ID NO:2, PSORT, Nakai and Kanehisa (1992) *Genomics* 14:897-911), which upon cleavage results in the production of a mature protein form. This mature protein form is approximately 1093 amino acid residues in length (from about amino acid 26 to amino acid 1118 of SEQ ID NO:2).

[0034] Human MID 4460 contains the following regions or other structural features (for general information regarding PFAM identifiers, PS prefix and PF prefix domain identification numbers, refer to Sonnhammer *et al.* (1997) *Protein* 28:405-420 and <http://www.psc.edu/general/software/packages/pfam/pfam.html>):

[0035] a fibronectin type III domain (PFAM Accession Number PF00041) located at about amino acid residues 28 to 108, 119 to 201, 299 to 381, 388 to 469, 477 to 559, 567 to 656 of SEQ ID NO:2;

WO 03/025199

PCT/US02/29353

- [0036] a protein-tyrosine phosphatase domain (PFAM Accession Number PF00102) located at about amino acid residues 846 to 1080 of SEQ ID NO:2;
- [0037] a phosphatase hydrolase glycoprotein repeat transmembrane signal precursor protein domain (ProDom No. PD016388) located at about amino acid residues 20 to 756 of SEQ ID NO:2;
- [0038] a phosphatase hydrolase protein-tyrosine PTPase domain (ProDom No. PD061758) located at about amino acid residues 31 to 1027 of SEQ ID NO:2;
- [0039] a phosphatase tyrosine SAP-1 receptor-type PTP precursor cancer-associated hydrolase protein-tyrosine domain (ProDom No. PD127840) located at about amino acid residues 779 to 814 of SEQ ID NO:2;
- [0040] a phosphatase type hydrolase non-receptor PTPase tyrosine phosphotyrosine domain (ProDom No. PD097276) located at about amino acid residues 783 to 865 of SEQ ID NO:2;
- [0041] a phosphatase hydrolase tyrosine repeat osteotesticular precursor cell signal glycoprotein transmembrane domain (ProDom No. PD038230) located at about amino acid residues 797 to 954 of SEQ ID NO:2;
- [0042] a hydrolase phosphatase receptor tyrosine protein-tyrosine precursor signal immunoglobulin domain transmembrane domain (ProDom No. PD333871) located at about amino acid residues 917 to 1027 of SEQ ID NO:2;
- [0043] a hydrolase R09E10.2 similar T22C1.8 F54F12.1 F36H1.3 protein-tyrosine phosphatase H06I04.5 domain (ProDom No. PD028836) located at about amino acid residues 971 to 1978 of SEQ ID NO:2;
- [0044] a H phosphatase tyrosine transmembrane domain (ProDom No. PD312226) located at about amino acid residues 27 to 756 of SEQ ID NO:2;
- [0045] two transmembrane domains (predicted by MEMSAT, Jones *et al.* (1994) *Biochemistry* 33:3038-3049) at about amino acids 8 to 25 and 754 to 778 of SEQ ID NO:2 or at about amino acids 59 to 76 and 729 to 753 of the mature protein (SEQ ID NO:4);
- [0046] a tyrosine specific protein phosphatase active site located at about amino acids 1020 to 1032 (VHCSAGVGRTGTL) of SEQ ID NO:2;
- [0047] five dileucine motifs (PSORT, <http://psort.nibb.ac.jp>.) located at about amino acids 965 to 966, 966 to 967, 967 to 968, 998 to 999, and 1038 to 1039 of SEQ ID NO:2;
- [0048] nine protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005) located at about amino acids 197 to 199 (SSR), 289 to 291 (SWR), 377 to 379 (SSR), 533 to 535 (TLK), 624

WO 03/025199

PCT/US02/29353

to 626 (TSR), 961 to 963 (TVR), 977 to 979 (SVR), 1103 to 1105 (STR), and 1114 to 1116 (SWR) of SEQ ID NO:2;

**[0049]** seventeen casein kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006) located at about amino acids 197 to 200 (SSRE), 237 to 240 (TELD), 245 to 248 (SALE), 263 to 266 (SPVD), 377 to 380 (SSRE), 484 to 487 (SKQD), 528 to 531 (SGTD), 533 to 536 (TLKE), 665 to 668 (TYPD), 713 to 716 (SCGE), 735 to 738 (TIWD), 798 to 801 (SPGD), 842 to 845 (SASE), 887 to 890 (SPQE), 901 to 904 (TVGD), 961 to 964 (TVRE), and 993 to 996 (SSPD) of SEQ ID NO:2;

**[0050]** one cAMP/cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (Prosite PS00004) located at about amino acids 1091 to 1094 (RRKS) of SEQ ID NO:2;

**[0051]** one tyrosine kinase phosphorylation site (Prosite PS00007) located at about amino acids 626 to 632 (RTNETWY);

**[0052]** twenty-seven N-glycosylation sites (Prosite PS00001) located at about amino acids 35 to 38 (NLTV), 78 to 81 (NITA), 83 to 86 (NVTV), 107 to 110 (NSSV), 132 to 135 (NSSI), 149 to 152 (NSTY), 172 to 175 (NITV), 196 to 199 (N SSR), 203 to 206 (NATT), 286 to 289 (NSSS), 304 to 307 (NLTV), 312 to 315 (NSSI), 329 to 332 (NSTY), 352 to 355 (NITV), 376 to 379 (N SSR), 383 to 386 (NATT), 401 to 404 (NSSI), 436 to 439 (NTTN), 470 to 473 (NVSD), 490 to 493 (NSTI), 558 to 561 (NSTL), 575 to 578 (NETQ), 622 to 625 (NQTS), 628 to 631 (NETW), 644 to 647 (NFTV), 878 to 881 (NASF), and 959 to 962 (NWTV) of SEQ ID NO:2; and

**[0053]** twenty-six N-myristoylation sites (Prosite PS00008) located at about amino acids 3 to 8 (GAGGGL), 9 to 14 (GVWGNL), 72 to 77 (GITETR), 88 to 93 (GLGPGS), 105 to 110 (GVNSSV), 111 to 116 (GTVTTA), 153 to 158 (GVEYTG), 160 to 165 (GGRAGT), 177 to 182 (GLEPGC), 194 to 199 (GIN SSR), 267 to 272 (GLGPGS), 284 to 289 (GVNSSS), 333 to 338 (GVEYTG), 340 to 345 (GGRAGT), 374 to 379 (GIN SSR), 430 to 435 (GGTETR), 450 to 455 (GILYTF), 463 to 468 (GARGSR), 529 to 534 (GTDITL), 640 to 645 (GILYNF), 693 to 698 (GGYEAF), 703 to 708 (GGQRGS), 722 to 727 (GLGPAR), 755 to 760 (GVIAGA), 1025 to 1030 (GVGRTG), and 1080 to 1085 (GSSNSQ) of SEQ ID NO:2.

**[0054]** The MID 4460 protein contains a significant number of structural characteristics in common with members of the tyrosine phosphatase family and the fibronectin family. The term "family" when referring to the protein and nucleic acid molecules of the invention means two or more proteins or nucleic acid molecules having a common structural domain or motif and having sufficient amino acid or nucleotide sequence homology as defined herein.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Such family members can be naturally or non-naturally occurring and can be from either the same or different species. For example, a family can contain a first protein of human origin as well as other distinct proteins of human origin, or alternatively, can contain homologs of non-human origin, e.g., rat or mouse proteins. Members of a family also can have common functional characteristics.

**[0055]** As used herein, the term “tyrosine phosphatase” or “PTPase” includes a protein or polypeptide which is capable of catalyzing the hydrolysis of a phosphate ester bond of a phosphorylated tyrosine, serine, or threonine residue, preferably the phosphorylated amino acid residue is part of a peptide, polypeptide, or protein.

**[0056]** Members of a tyrosine phosphatase family of proteins are characterized by a receptor-like extracellular regions connected to the intracellular (catalytic) domains by a short transmembrane segment (Streuli and Saito, 1993, *Adv. Prot. Phosphatases* 7:67-94). The non-transmembrane (cytoplasmic) PTPases typically include at least one catalytic domain (Koch *et al.* 1991, *Science* 252:1013-1016). An alignment of the MID 4460 protein with protein tyrosine phosphatase precursor (EC 3.1.3.48), receptor type H precursor is shown in Figure 5 and demonstrates about 100% sequence identity between the two sequences (as calculated in matblas from the blosum62.ijj matrix).

**[0057]** A MID 4460 polypeptide can include a “protein-tyrosine phosphatase domain” or regions homologous with a “protein-tyrosine phosphatase domain”. A MID 4460 polypeptide can include or further include a “fibronectin type III domain” or regions homologous with a “fibronectin type III domain,” and at least one catalytic region.

**[0058]** As used herein, the term “protein-tyrosine phosphatase domain” includes an amino acid sequence of about 200 to 400 amino acid residues in length and having a bit score for the alignment of the sequence to the protein-tyrosine phosphatase domain (HMM) of at least 300. Preferably a protein-tyrosine phosphatase domain mediates the catalysis of the hydrolysis of a phosphate ester bond. Preferably, a protein-tyrosine phosphatase domain includes at least about 100 to 500 amino acids, more preferably about 200 to 300 amino acid residues, or about 250 to 300 amino acids and has a bit score for the alignment of the sequence to the protein-tyrosine phosphatase domain (HMM) of at least 300, 350, 375, or greater. A protein-tyrosine phosphatase domain is capable of catalyzing the hydrolysis of a phosphate ester bond. The protein-tyrosine phosphatase domain can include a Prosite tyrosine specific protein phosphatase active site signature sequence PS00383 ([LIVMF]-H-C-x(2)-G-x(3)-[STC]-[STAGP]-x-[LIVMFY]), or sequences homologous thereto. In the above conserved signature sequence, and other motifs or signature sequences described herein, the

WO 03/025199

PCT/US02/29353

standard IUPAC one-letter code for the amino acids is used. Each element in the pattern is separated by a dash (-); square brackets ([ ]) indicate the particular residues that are accepted at that position; x indicates that any residue is accepted at that position; and numbers in parentheses () indicate the number of residues represented by the accompanying amino acid. The protein-tyrosine phosphatase domain is located in the C-terminal cytoplasmic domain of human MID 4460 polypeptide and which corresponds to about amino acids 1020 to 1032 of SEQ ID NO:2. The protein-tyrosine phosphatase domain (HMM) has been assigned the PFAM Accession Number PF00102 (<http://genome.wustl.edu/Pfam/.html>). Additionally, the protein-tyrosine phosphatase domain (HMM) has been assigned the SMART identifier ptp\_7 or PTPc\_3 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). As used herein, the "protein-tyrosine phosphatase domain" is a portion of the human MID 4460 protein which is homologous, *e.g.*, at least about 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to either or both of the following ProDom family "H phosphatase tyrosine transmembrane-type" domain (ProDomain Release 2001.1; <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>, Figure 4). An alignment of the protein-tyrosine phosphatase domain (amino acids 1 to 217 of SEQ ID NO:2) of human MID 4460 with PD312226, SEQ ID NO:X, derived from a BLAST search model shows 100% identity (as calculated in ProDomain from the blosum62 matrix, Figure 4). An alignment of the protein-tyrosine phosphatase domain (amino acids 846 to 1080 of SEQ ID NO:2) of human MID 4460 with the Pfam protein-tyrosine consensus amino acid sequence (SEQ ID NO:X) derived from a hidden Markov model is depicted in Figure 3.

**[0059]** In a preferred embodiment, a MID 4460 polypeptide or protein has a "protein tyrosine phosphatase domain" or a region which includes at least about 200 to 300, more preferably about 250 to 300, or 275 to 300 amino acid residues and has at least about 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, or 100% homology with a "protein tyrosine phosphatase domain," *e.g.*, the protein tyrosine phosphatase domain of human MID 4460 (*e.g.*, residues 846 to 1080 of SEQ ID NO:2).

**[0060]** To identify the presence of a "protein tyrosine phosphatase" domain in a MID 4460 protein sequence, and make the determination that a polypeptide or protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein can be searched against the Pfam database of HMMs (*e.g.*, the Pfam database, release 2.1) using the default parameters ([http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM\\_search](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search)). For example, the hmmsf program, which is available as part of the HMMER package of search programs, is a family specific default program for MILPAT0063 and a score of 15 is the default threshold score for

WO 03/025199

PCT/US02/29353

determining a hit. Alternatively, the threshold score for determining a hit can be lowered (e.g., to 8 bits). A description of the Pfam database can be found in Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28:405-420 and a detailed description of HMMs can be found, for example, in Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; and Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314, the contents of which are incorporated herein by reference. A search was performed against the HMM database resulting in the identification of a "protein-tyrosine phosphatase" domain in the amino acid sequence of human MID 4460 at about residues 846 to 1080 of SEQ ID NO:2 (see Figure 1).

**[0061]** An additional method to identify the presence of a "protein tyrosine phosphatase" domain in a MID 4460 protein sequence, and make the determination that a polypeptide or protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein can be searched against a SMART database (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) of HMMs as described in Schultz *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 and Schultz *et al.* (2000) *Nucl. Acids Res* 28:231. The database contains domains identified by profiling with the hidden Markov models of the HMMer2 search program (Durbin *et al.* (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press.; <http://hmmerr.wustl.edu/>). The database also is extensively annotated and monitored by experts to enhance accuracy. A search was performed against the HMM database resulting in the identification of a "protein tyrosine kinase" domain in the amino acid sequence of human MID 4460 at about residues 821 to 1083 of SEQ ID NO:2 (see Figure 1).

**[0062]** For further identification of domains in a MID 4460 protein sequence, and make the determination that a polypeptide or protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein can be searched against a database of domains, e.g., the ProDom database (Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). The ProDom protein domain database consists of an automatic compilation of homologous domains. Current versions of ProDom are built using recursive PSI-BLAST searches (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340) of the SWISS-PROT 38 and TREMBL protein databases. The database automatically generates a consensus sequence for each domain. A BLAST search was performed against the HMM database resulting in the identification of a "protein tyrosine phosphatase" domain in the amino acid sequence of human MID 4460 at about residues 27 to 756 of SEQ ID NO:2 (see Figure 1).



WO 03/025199

PCT/US02/29353

[0063] A MID 4460 molecule can further include a fibronectin type III domain, preferably two, three, four, five, or six fibronectin type III domains at about residues 28 to 108, about 119 to 201, about 299 to 381, about 388 to 469, about 477 to 559, and about 567 to 656 of SEQ ID NO:2.

[0064] A MID 4460 polypeptide can include at least one, preferably two "transmembrane domains" or regions homologous with a "transmembrane domain". As used herein, the term "transmembrane domain" includes an amino acid sequence of about 10 to 40 amino acid residues in length and spans the plasma membrane. Transmembrane domains are rich in hydrophobic residues, *e.g.*, at least 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, or more of the amino acids of a transmembrane domain are hydrophobic, *e.g.*, leucines, isoleucines, tyrosines, or tryptophans. Transmembrane domains typically have alpha-helical structures and are described in, for example, Zagotta *et al.*, (1996) *Annual Rev. Neurosci.* 19:235-263, the contents of which are incorporated herein by reference. The transmembrane domains of human MID 4460 is located at about residues 8 to 25 and 754 to 778 of SEQ ID NO:2 or at about residues 59 to 76 and 729 to 753 of SEQ ID NO:4.

[0065] In a preferred embodiment, a MID 4460 polypeptide or protein has at least one, preferably two "transmembrane domains" or a region which includes at least about 12 to 35 more preferably about 14 to 30 or 15 to 25 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80% 90% 95%, 99%, or 100% homology with a "transmembrane domain," *e.g.*, the transmembrane domains of human MID 4460 (*e.g.*, residues 8 to 25 and 754 to 778 of SEQ ID NO:2). The transmembrane domain of human MID 4460 is visualized in the hydropathy plot (Figure 2) as regions of about 15 to 25 amino acids where the hydropathy trace is mostly above the horizontal line.

[0066] To identify the presence of a "transmembrane" domain in a MID 4460 protein sequence, and make the determination that a polypeptide or protein of interest has a particular profile, the amino acid sequence of the protein can be analyzed by a transmembrane prediction method that predicts the secondary structure and topology of integral membrane proteins based on the recognition of topological models (MEMSAT, Jones *et al.*, (1994) *Biochemistry* 33:3038-3049).

[0067] A MID 4460 polypeptide can include at least one, preferably two "non-transmembrane regions." As used herein, the term "non-transmembrane region" includes an amino acid sequence not identified as a transmembrane domain. The non-transmembrane regions in MID 4460 are located at about amino acids 1 to 754 and 778 to 1118 of SEQ ID NO:2. The non-transmembrane region may be cytoplasmic or extracellular. The

WO 03/025199

PCT/US02/29353

extracellular portion (about amino acids 1 to 754 of SEQ ID NO:2) may act as an adhesion molecule, may bind a specific ligand, and/or may be important in cell-to-cell contact. The cytoplasmic portion (about amino acids 778 to 1118 of SEQ ID NO:2) may contain the catalytic domain.

**[0068]** The non-transmembrane regions of MID 4460 include at least one cytoplasmic region. When located at the C-terminus, the cytoplasmic region is referred to herein as the "C-terminal cytoplasmic domain." As used herein, an "C-terminal cytoplasmic domain" includes an amino acid sequence having about 1 to 400, preferably about 1 to 375, more preferably about 1 to 350, or even more preferably about 1 to 340 amino acid residues in length, is located inside of a cell or within the cytoplasm of a cell and has catalytic domain. The N-terminal amino acid residue of an "C-terminal cytoplasmic domain" is adjacent to an C-terminal amino acid residue of a transmembrane domain in a MID 4460 protein. For example, an C-terminal cytoplasmic domain is located at about amino acid residues 778 to 1118 of SEQ ID NO:2.

**[0069]** In a preferred embodiment, a MID 4460 polypeptide or protein has a C-terminal cytoplasmic domain or a region which includes at least about 300, preferably about 300 to 400, and more preferably about 300 to 350 amino acid residues and has at least about 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, or 100% homology with a "C-terminal cytoplasmic domain", *e.g.*, the C-terminal cytoplasmic domain of human MID 4460 (*e.g.*, residues 778 to 1118 of SEQ ID NO:2).

**[0070]** The non-transmembrane regions of MID 4460 include at least one extracellular region. When located at the N-terminus, the extracellular region is referred to herein as the "N-terminal extracellular domain." As used herein, an "N-terminal extracellular domain" includes an amino acid sequence having about 1 to 800, preferably about 1 to 775, more preferably about 1 to 760, or even more preferably about 1 to 754 amino acid residues in length, is located inside of a cell or within the cytoplasm of a cell and has catalytic domain. The C-terminal amino acid residue of an "N-terminal extracellular domain" is adjacent to an N-terminal amino acid residue of a transmembrane domain in a MID 4460 protein. For example, an N-terminal extracellular domain is located at about amino acid residues 1 to 754 of SEQ ID NO:2.

**[0071]** In a preferred embodiment, a MID 4460 polypeptide or protein has an N-terminal extracellular domain or a region which includes about 1 to 800, preferably about 1 to 775, and more preferably about 1 to 750 amino acid residues and has at least about 60%, 70% 80%

WO 03/025199

PCT/US02/29353

90% 95%, 99%, or 100% homology with an "N-terminal extracellular domain," *e.g.*, the N-terminal extracellular domain of human MID 4460 (*e.g.*, residues 1 to 754 of SEQ ID NO:2).

[0072] A human MID 4460 protein can further include a dileucine motif (*e.g.*, residues 965 to 966, 966 to 967, 967 to 968, 998 to 999, and 1038 to 1039 of SEQ ID NO:2) and/or a tyrosine specific protein phosphatase active site sequence (*e.g.*, residues 1020 to 1032 of SEQ ID NO:2).

[0073] A MID 4460 family member can include at least one, two, three, four, five, or six fibronectin type III domains or at least one protein tyrosine phosphatase domain or transmembrane or non-transmembrane domains. A MID 4460 family member can include at least one tyrosine specific protein phosphatase active site sequence (Prosite PS00383).

Furthermore, a MID 4460 family member can include at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, preferably seventeen casein kinase II phosphorylation sites (Prosite PS00006); at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, and preferably nine protein kinase C phosphorylation sites (Prosite PS00005); at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, eighteen, nineteen, twenty, twenty-one, twenty-two, twenty-three, twenty-four, twenty-five, twenty-six, and preferably twenty-seven N-glycosylation site (Prosite PS00001); at least one cAMP/cGMP protein kinase phosphorylation site (Prosite PS00004); at least one tyrosine kinase phosphorylation site (Prosite PS00007); and at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, eighteen, nineteen, twenty, twenty-one, twenty-two, twenty-three, twenty-four, twenty-five, and preferably twenty-six N-myristoylation sites (Prosite PS00008).

[0074] As the MID 4460 polypeptides of the invention can modulate MID 4460-mediated activities, they can be useful for developing novel diagnostic and therapeutic agents for tyrosine phosphatase-associated or other MID 4460-associated disorders, as described below.

[0075] As used herein, a "tyrosine phosphatase-associated activity" includes an activity which involves catalysis of the hydrolysis reaction of a phosphate ester bond. The activity may also involve the interaction of a phosphatase protein with a target molecule such as a phosphorylated protein or peptide. Members of the family can play a role in cardiovascular disease or neoplastic diseases.

[0076] As used herein, a "MID 4460 activity", "biological activity of MID 4460" or "functional activity of MID 4460", refers to an activity exerted by a MID 4460 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on *e.g.*, a MID 4460-responsive cell or on a MID 4460

WO 03/025199

PCT/US02/29353

substrate, *e.g.*, a protein substrate, as determined *in vivo* or *in vitro*. In one embodiment, a MID 4460 activity is a direct activity, such as an association with a MID 4460 target molecule. A "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a MID 4460 protein binds or interacts in nature. In an exemplary embodiment, MID 4460 is a receptor and enzyme for a phosphorylated substrate. The binding of a ligand to the receptor portion of MID 4460 may regulate the phosphatase activity of the protein. The enzymatic portion may bind to a substrate containing a phosphorylated amino acid residue such as a tyrosine, threonine, or serine, and catalyze the hydrolysis of the phosphoester bond.

[0077] A MID 4460 activity can also be an indirect activity, *e.g.*, a cellular signaling activity mediated by interaction of the MID 4460 protein with a MID 4460 receptor. Based on the above-described sequence structures and similarities to molecules of known function, the MID 4460 molecules of the present invention can have similar biological activities as tyrosine phosphatase family members. For example, the MID 4460 proteins of the present invention can have one or more of the following activities: (1) the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphoester bond; (2) the ability to bind a ligand; (3) the ability to dephosphorylate a phosphorylated protein; (4) the ability to mediate signal transduction; and (5) the ability to act as an adhesion molecule.

[0078] The MID 4460 molecules of the invention can modulate the activities of cells in tissues where they are expressed. For example, MID 4460 mRNA is expressed in liver, heart, colon, pancreas, brain, spleen, and small intestines. Accordingly, the MID 4460 molecules of the invention can act as therapeutic or diagnostic agents for cardiovascular, hepatic, gastrointestinal, or neurological disorders.

[0079] Thus, the MID 4460 molecules can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more cardiovascular or other tyrosine phosphatase disorders. As used herein, "tyrosine phosphatase disorders" are diseases or disorders whose pathogenesis is caused by, is related to, or is associated with aberrant or deficient tyrosine phosphatase protein function or expression. Examples of such disorders, *e.g.*, tyrosine phosphatase-associated or other MID 4460-associated disorders, include but are not limited to, cellular proliferative and/or differentiative disorders, immune *e.g.*, inflammatory, disorders, cardiovascular disorders, endothelial cell disorders, or liver disorders.

[0080] Examples of cellular proliferative and/or differentiative disorders include cancer, *e.g.*, carcinoma, sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic neoplastic disorders, *e.g.*, leukemias. A metastatic tumor can arise from a multitude of primary tumor types, including but not limited to those of prostate, colon, lung, breast and liver origin.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[0081] The MID 4460 molecules can be used to treat cardiovascular disorders in part because tyrosine phosphatase family members are found in the heart and liver. The MID 4460 may be used to affect the biosynthesis of lipid risk factors (*e.g.*, HDL, LDL, triglycerides) associated with atherosclerosis. As used herein, disorders involving the heart, or "cardiovascular disease" or a "cardiovascular disorder" includes a disease or disorder which affects the cardiovascular system, *e.g.*, the heart, the blood vessels, and/or the blood. A cardiovascular disorder can be caused by an imbalance in arterial pressure, a malfunction of the heart, or an occlusion of a blood vessel, *e.g.*, by a thrombus. A cardiovascular disorder includes, but is not limited to disorders such as arteriosclerosis, atherosclerosis, cardiac hypertrophy, ischemia reperfusion injury, restenosis, arterial inflammation, vascular wall remodeling, ventricular remodeling, rapid ventricular pacing, coronary microembolism, tachycardia, bradycardia, pressure overload, aortic bending, coronary artery ligation, vascular heart disease, valvular disease, including but not limited to, valvular degeneration caused by calcification, rheumatic heart disease, endocarditis, or complications of artificial valves; atrial fibrillation, long-QT syndrome, congestive heart failure, sinus node dysfunction, angina, heart failure, hypertension, atrial fibrillation, atrial flutter, pericardial disease, including but not limited to, pericardial effusion and pericarditis; cardiomyopathies, *e.g.*, dilated cardiomyopathy or idiopathic cardiomyopathy, myocardial infarction, coronary artery disease, coronary artery spasm, ischemic disease, arrhythmia, sudden cardiac death, and cardiovascular developmental disorders (*e.g.*, arteriovenous malformations, arteriovenous fistulae, raynaud's syndrome, neurogenic thoracic outlet syndrome, causalgia/reflex sympathetic dystrophy, hemangioma, aneurysm, cavernous angioma, aortic valve stenosis, atrial septal defects, atrioventricular canal, coarctation of the aorta, ebsteins anomaly, hypoplastic left heart syndrome, interruption of the aortic arch, mitral valve prolapse, ductus arteriosus, patent foramen ovale, partial anomalous pulmonary venous return, pulmonary atresia with ventricular septal defect, pulmonary atresia without ventricular septal defect, persistence of the fetal circulation, pulmonary valve stenosis, single ventricle, total anomalous pulmonary venous return, transposition of the great vessels, tricuspid atresia, truncus arteriosus, ventricular septal defects). A cardiovascular disease or disorder also can include an endothelial cell disorder.

[0082] As used herein, the term "cancer" (also used interchangeably with the terms, "hyperproliferative" and "neoplastic") refers to cells having the capacity for autonomous growth, *i.e.*, an abnormal state or condition characterized by rapidly proliferating cell growth. Cancerous disease states may be categorized as pathologic, *i.e.*, characterizing or constituting

WO 03/025199

PCT/US02/29353

a disease state, *e.g.*, malignant tumor growth, or may be categorized as non-pathologic, *i.e.*, a deviation from normal but not associated with a disease state, *e.g.*, cell proliferation associated with wound repair. The term is meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues, or organs, irrespective of histopathologic type or stage of invasiveness. The term "cancer" includes malignancies of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, thyroid, lymphoid, gastrointestinal, and genito-urinary tract, as well as adenocarcinomas which include malignancies such as most colon cancers, renal-cell carcinoma, prostate cancer and/or testicular tumors, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus. The term "carcinoma" is art recognized and refers to malignancies of epithelial or endocrine tissues including respiratory system carcinomas, gastrointestinal system carcinomas, genitourinary system carcinomas, testicular carcinomas, breast carcinomas, prostatic carcinomas, endocrine system carcinomas, and melanomas. Exemplary carcinomas include those forming from tissue of the cervix, lung, prostate, breast, head and neck, colon and ovary. The term "carcinoma" also includes carcinosarcomas, *e.g.*, which include malignant tumors composed of carcinomatous and sarcomatous tissues. An "adenocarcinoma" refers to a carcinoma derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures. The term "sarcoma" is art recognized and refers to malignant tumors of mesenchymal derivation.

[0083] The MID 4460 molecules of the invention can be used to monitor, treat and/or diagnose a variety of proliferative disorders. Such disorders include hematopoietic neoplastic disorders. As used herein, the term "hematopoietic neoplastic disorders" includes diseases involving hyperplastic/neoplastic cells of hematopoietic origin, *e.g.*, arising from myeloid, lymphoid or erythroid lineages, or precursor cells thereof. Preferably, the diseases arise from poorly differentiated acute leukemias, *e.g.*, erythroblastic leukemia and acute megakaryoblastic leukemia. Additional exemplary myeloid disorders include, but are not limited to, acute promyeloid leukemia (APML), acute myelogenous leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML) (reviewed in Vaickus (1991) *Crit Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); lymphoid malignancies include, but are not limited to acute lymphoblastic leukemia (ALL) which includes B-lineage ALL and T-lineage ALL, chronic lymphocytic leukemia (CLL), prolymphocytic leukemia (PLL), hairy cell leukemia (HCL) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM). Additional forms of malignant lymphomas include, but are not limited to non-Hodgkin lymphoma and variants thereof, peripheral T cell

WO 03/025199

PCT/US02/29353

lymphomas, adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), large granular lymphocytic leukemia (LGL), Hodgkin's disease, and Reed-Sternberg disease.

[0084] Aberrant expression and/or activity of MID 4460 molecules can mediate disorders associated with bone metabolism. "Bone metabolism" refers to direct or indirect effects in the formation or degeneration of bone structures, *e.g.*, bone formation, bone resorption, etc., which can ultimately affect the concentrations in serum of calcium and phosphate. This term also includes activities mediated by MID 4460 molecules in bone cells, *e.g.* osteoclasts and osteoblasts, that can in turn result in bone formation and degeneration. For example, MID 4460 molecules can support different activities of bone resorbing osteoclasts such as the stimulation of differentiation of monocytes and mononuclear phagocytes into osteoclasts. Accordingly, MID 4460 molecules that modulate the production of bone cells can influence bone formation and degeneration, and thus can be used to treat bone disorders. Examples of such disorders include, but are not limited to, osteoporosis, osteodystrophy, osteomalacia, rickets, osteitis fibrosa cystica, renal osteodystrophy, osteosclerosis, anti-convulsant treatment, osteopenia, fibrogenesis-imperfecta ossium, secondary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism, hyperparathyroidism, cirrhosis, obstructive jaundice, drug induced metabolism, medullary carcinoma, chronic renal disease, rickets, sarcoidosis, glucocorticoid antagonism, malabsorption syndrome, steatorrhea, tropical sprue, idiopathic hypercalcemia and milk fever.

[0085] The MID 4460 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of immune, *e.g.*, inflammatory, (*e.g.* respiratory inflammatory) disorders. Examples of immune disorders or diseases include, but are not limited to, autoimmune diseases (including, for example, diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, inflammatory bowel disease, *e.g.* Crohn's disease and ulcerative colitis, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, asthma, allergic asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis, acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polychondritis, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen

WO 03/025199

PCT/US02/29353

planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, and interstitial lung fibrosis), graft-versus-host disease, cases of transplantation, and allergy such as, atopic allergy.

**[0086]** As used herein, an "endothelial cell disorder" includes a disorder characterized by aberrant, unregulated, or unwanted endothelial cell activity, *e.g.*, proliferation, migration, angiogenesis, or vascularization; or aberrant expression of cell surface adhesion molecules or genes associated with angiogenesis, *e.g.*, TIE-2, FLT and FLK. Endothelial cell disorders include tumorigenesis, tumor metastasis, psoriasis, diabetic retinopathy, endometriosis, Grave's disease, ischemic disease (*e.g.*, atherosclerosis), and chronic inflammatory diseases (*e.g.*, rheumatoid arthritis).

**[0087]** Disorders which can be treated or diagnosed by methods described herein include, but are not limited to, disorders associated with an accumulation in the liver of fibrous tissue, such as that resulting from an imbalance between production and degradation of the extracellular matrix accompanied by the collapse and condensation of preexisting fibers. The methods described herein can be used to diagnose or treat hepatocellular necrosis or injury induced by a wide variety of agents including processes which disturb homeostasis, such as an inflammatory process, tissue damage resulting from toxic injury or altered hepatic blood flow, and infections (*e.g.*, bacterial, viral and parasitic). For example, the methods can be used for the early detection of hepatic injury, such as portal hypertension or hepatic fibrosis. In addition, the methods can be employed to detect liver fibrosis attributed to inborn errors of metabolism, for example, fibrosis resulting from a storage disorder such as Gaucher's disease (lipid abnormalities) or a glycogen storage disease, A1-antitrypsin deficiency; a disorder mediating the accumulation (*e.g.*, storage) of an exogenous substance, for example, hemochromatosis (iron-overload syndrome) and copper storage diseases (Wilson's disease), disorders resulting in the accumulation of a toxic metabolite (*e.g.*, tyrosinemia, fructosemia and galactosemia) and peroxisomal disorders (*e.g.*, Zellweger syndrome). Additionally, the methods described herein can be used for the early detection and treatment of liver injury associated with the administration of various chemicals or drugs, such as for example, methotrexate, isoniazid, oxyphenisatin, methyl dopa, chlorpromazine, tolbutamide or alcohol, or which represents a hepatic manifestation of a vascular disorder such as obstruction of either the intrahepatic or extrahepatic bile flow or an alteration in hepatic circulation resulting, for example, from chronic heart failure, veno-occlusive disease, portal vein thrombosis or Budd-Chiari syndrome.



WO 03/025199

PCT/US02/29353

[0088] Additionally, MID 4460 molecules can play an important role in the etiology of certain viral diseases, including but not limited to Hepatitis B, Hepatitis C, and Herpes Simplex Virus (HSV). Modulators of MID 4460 activity could be used to control viral diseases. The modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of viral infected tissue or virus-associated tissue fibrosis, especially liver and liver fibrosis. Also, MID 4460 modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of virus-associated carcinoma, especially hepatocellular cancer.

[0089] Additionally, MID 4460 can play an important role in the regulation of metabolism or pain disorders. Diseases of metabolic imbalance include, but are not limited to, obesity, anorexia nervosa, cachexia, lipid disorders, and diabetes. Examples of pain disorders include, but are not limited to, pain response elicited during various forms of tissue injury, *e.g.*, inflammation, infection, and ischemia, usually referred to as hyperalgesia (described in, for example, Fields (1987) *Pain*, New York:McGraw-Hill); pain associated with musculoskeletal disorders, *e.g.*, joint pain; tooth pain; headaches; pain associated with surgery; pain related to irritable bowel syndrome; or chest pain.

[0090] The MID 4460 protein, fragments thereof, and derivatives and other variants of the sequence in SEQ ID NO:2 thereof are collectively referred to as "polypeptides or proteins of the invention" or "MID 4460 polypeptides or proteins". Nucleic acid molecules encoding such polypeptides or proteins are collectively referred to as "nucleic acids of the invention" or "MID 4460 nucleic acids."

[0091] As used herein, the term "nucleic acid molecule" includes DNA molecules (*e.g.*, a cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (*e.g.*, an mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated, *e.g.*, by the use of nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

[0092] The term "isolated or purified nucleic acid molecule" includes nucleic acid molecules which are separated from other nucleic acid molecules which are present in the natural source of the nucleic acid. For example, with regards to genomic DNA, the term "isolated" includes nucleic acid molecules which are separated from the chromosome with which the genomic DNA is naturally associated. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (*i.e.*, sequences located at the 5' and/or 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of 5' and/or 3' nucleotide

WO 03/025199

PCT/US02/29353

sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

[0093] As used herein, the term "hybridizes under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions" describes conditions for hybridization and washing. Guidance for performing hybridization reactions can be found in *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, which is incorporated by reference. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. Specific hybridization conditions referred to herein are as follows: 1) low stringency hybridization conditions in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by two washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at least at 50°C (the temperature of the washes can be increased to 55°C for low stringency conditions); 2) medium stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C; 3) high stringency hybridization conditions in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C; and preferably 4) very high stringency hybridization conditions are 0.5M sodium phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C. Very high stringency conditions (4) are the preferred conditions and the ones that should be used unless otherwise specified.

[0094] As used herein, a "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (e.g., encodes a natural protein).

[0095] As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules which include an open reading frame encoding a MID 4460 protein, preferably a mammalian MID 4460 protein, and can further include non-coding regulatory sequences, and introns.

[0096] An "isolated" or "purified" polypeptide or protein is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. In one embodiment, the language "substantially free" means preparation of MID 4460 protein having less than about 30%, 20%, 10% and more preferably 5% (by dry weight), of non-MID 4460 protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), or of

WO 03/025199

PCT/US02/29353

chemical precursors or non-MID 4460 chemicals. When the MID 4460 protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, i.e., culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation. The invention includes isolated or purified preparations of at least 0.01, 0.1, 1.0, and 10 milligrams in dry weight.

[0097] A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of MID 4460 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO:1 or 3) without abolishing or more preferably, without substantially altering a biological activity, whereas an "essential" amino acid residue results in such a change. For example, amino acid residues that are conserved among the polypeptides of the present invention, *e.g.*, those present in the protein tyrosine phosphatase or fibronectin domains, are predicted to be particularly unamenable to alteration.

[0098] A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a MID 4460 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 MID 4460 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for MID 4460 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined.

[0099] As used herein, a "biologically active portion" of a MID 4460 protein includes a fragment of a MID 4460 protein which participates in an interaction between a MID 4460 molecule and a non-MID 4460 molecule. Biologically active portions of a MID 4460 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the MID 4460 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include fewer amino acids than the full length MID 4460 protein,

WO 03/025199

PCT/US02/29353

and exhibit at least one activity of a MID 4460 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the MID 4460 protein, *e.g.*, the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphoester bond. A biologically active portion of a MID 4460 protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100, 200 or more amino acids in length. Biologically active portions of a MID 4460 protein can be used as targets for developing agents which modulate a MID 4460 mediated activity, *e.g.*, the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphoester bond.

**[00100]** Calculations of homology or sequence identity (the terms "homology" and "identity" are used interchangeably herein) between sequences are performed as follows:

**[00101]** To determine the percent identity of two amino acid sequences, or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence (*e.g.*, when aligning a second sequence to the MID 4460 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 1118 amino acid residues, 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% amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

**[00102]** The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. In a preferred embodiment, the percent identity between two amino acid sequences is determined using the Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453 algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a

WO 03/025199

PCT/US02/29353

length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In yet another preferred embodiment, the percent identity between two nucleotide sequences is determined using the GAP program in the GCG software package (available at <http://www.gcg.com>), using a NWSgapdna.CMP matrix and a gap weight of 40, 50, 60, 70, or 80 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6. A particularly preferred set of parameters (and the one that should be used if the practitioner is uncertain about what parameters should be applied to determine if a molecule is within a sequence identity or homology limitation of the invention) are a Blossum 62 scoring matrix with a gap penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5.

**[00103]** The percent identity between two amino acid or nucleotide sequences can be determined using the algorithm of Meyers and Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

**[00104]** The nucleic acid and protein sequences described herein can be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for example, identify other family members or related sequences. Such searches can be performed using the NBLAST and XBLAST programs (version 2.0) of Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to MID 4460 nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to MID 4460 protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

**[00105]** Particular MID 4460 polypeptides of the present invention have an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. In the context of an amino acid sequence, the term "substantially identical" is used herein to refer to a first amino acid that contains a sufficient or minimum number of amino acid residues that are i) identical to, or ii) conservative substitutions of aligned amino acid residues in a second amino acid sequence such that the first and second amino acid sequences can have a common structural domain and/or common functional activity. For example, amino acid sequences that contain a common structural domain having at least about 60%, or 65% identity, likely

WO 03/025199

PCT/US02/29353

75% identity, more likely 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to SEQ ID NO:2 are termed substantially identical.

[00106] In the context of nucleotide sequence, the term "substantially identical" is used herein to refer to a first nucleic acid sequence that contains a sufficient or minimum number of nucleotides that are identical to aligned nucleotides in a second nucleic acid sequence such that the first and second nucleotide sequences encode a polypeptide having common functional activity, or encode a common structural polypeptide domain or a common functional polypeptide activity. For example, nucleotide sequences having at least about 60%, or 65% identity, likely 75% identity, more likely 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to SEQ ID NO:1 or 3 are termed substantially identical.

[00107] "Misexpression or aberrant expression", as used herein, refers to a non-wild type pattern of gene expression, at the RNA or protein level. It includes: expression at non-wild type levels, i.e., over or under expression; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the time or stage at which the gene is expressed, e.g., increased or decreased expression (as compared with wild type) at a predetermined developmental period or stage; a pattern of expression that differs from wild type in terms of decreased expression (as compared with wild type) in a predetermined cell type or tissue type; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the splicing size, amino acid sequence, post-translational modification, or biological activity of the expressed polypeptide; a pattern of expression that differs from wild type in terms of the effect of an environmental stimulus or extracellular stimulus on expression of the gene, e.g., a pattern of increased or decreased expression (as compared with wild type) in the presence of an increase or decrease in the strength of the stimulus.

[00108] "Subject", as used herein, can refer to a mammal, e.g., a human, or to an experimental or animal or disease model. The subject can also be a non-human animal, e.g., a horse, cow, goat, or other domestic animal.

[00109] A "purified preparation of cells", as used herein, refers to, in the case of plant or animal cells, an *in vitro* preparation of cells and not an entire intact plant or animal. In the case of cultured cells or microbial cells, it consists of a preparation of at least 10% and more preferably 50% of the subject cells.

[00110] Various aspects of the invention are described in further detail below.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Isolated Nucleic Acid Molecules

[00111] In one aspect, the invention provides, an isolated or purified, nucleic acid molecule that encodes a MID 4460 polypeptide described herein, *e.g.*, a full length MID 4460 protein or a fragment thereof, *e.g.*, a biologically active portion of MID 4460 protein. Also included is a nucleic acid fragment suitable for use as a hybridization probe, which can be used, *e.g.*, to identify a nucleic acid molecule encoding a polypeptide of the invention, MID 4460 mRNA, and fragments suitable for use as primers, *e.g.*, PCR primers for the amplification or mutation of nucleic acid molecules.

[00112] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, or a portion of any of this nucleotide sequence. In one embodiment, the nucleic acid molecule includes sequences encoding the human MID 4460 protein (*i.e.*, "the coding region" of SEQ ID NO:1, as shown in SEQ ID NO:3), as well as 5' untranslated sequences (nucleotides 1 to 42 of SEQ ID NO:1) and 3' untranslated sequences (nucleotides 3399 to 3900 of SEQ ID NO:1). Alternatively, the nucleic acid molecule can include only the coding region of SEQ ID NO:1 (*e.g.*, SEQ ID NO:3) and, *e.g.*, no flanking sequences which normally accompany the subject sequence. In another embodiment, the nucleic acid molecule encodes a sequence corresponding to a fragment of the protein from about amino acid 846 to 1080 of SEQ ID NO:2.

[00113] In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention includes a nucleic acid molecule which is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a portion of any of these nucleotide sequences. In other embodiments, the nucleic acid molecule of the invention is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 such that it can hybridize to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 3, thereby forming a stable duplex.

[00114] In one embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the present invention includes a nucleotide sequence which is at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, or more homologous to the entire length of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a portion, preferably of the same length, of any of these nucleotide sequences.

MID 4460 Nucleic Acid Fragments

[00115] A nucleic acid molecule of the invention can include only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or 3. For example, such a nucleic acid molecule can include a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a MID

WO 03/025199

PCT/US02/29353

4460 protein, *e.g.*, an immunogenic or biologically active portion of a MID 4460 protein. A fragment can comprise those nucleotides of SEQ ID NO:1, which encode a protein tyrosine phosphatase domain or a fibronectin type III domain of human MID 4460. The nucleotide sequence determined from the cloning of the MID 4460 gene allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning other MID 4460 family members, or fragments thereof, as well as MID 4460 homologs, or fragments thereof, from other species.

**[00116]** In another embodiment, a nucleic acid includes a nucleotide sequence that includes part, or all, of the coding region and extends into either (or both) the 5' or 3' noncoding region. Other embodiments include a fragment which includes a nucleotide sequence encoding an amino acid fragment described herein. Nucleic acid fragments can encode a specific domain or site described herein or fragments thereof, particularly fragments thereof which are at least 100 amino acids in length. Fragments also include nucleic acid sequences corresponding to specific amino acid sequences described above or fragments thereof. Nucleic acid fragments should not be construed as encompassing those fragments that may have been disclosed prior to the invention.

**[00117]** A nucleic acid fragment can include a sequence corresponding to a domain, region, or functional site described herein. A nucleic acid fragment can also include one or more domain, region, or functional site described herein. Thus, for example, a MID 4460 nucleic acid fragment can include a sequence corresponding to a protein tyrosine phosphatase domain or a fibronectin type III domain, as described herein.

**[00118]** MID 4460 probes and primers are provided. Typically a probe/primer is an isolated or purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically includes a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 7, 12 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 75 consecutive nucleotides of a sense or antisense sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

**[00119]** In a preferred embodiment the nucleic acid is a probe which is at least 5 or 10, and less than 200, more preferably less than 100, or less than 50, base pairs in length. It should be identical, or differ by 1, or less than in 5 or 10 bases, from a sequence disclosed herein. If alignment is needed for this comparison the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.



WO 03/025199

PCT/US02/29353

**[00120]** A probe or primer can be derived from the sense or anti-sense strand of a nucleic acid which encodes: a signal sequence from about amino acid 1 to 25 of SEQ ID NO:2; a N-terminal extracellular domain from about amino acid 1 to 754 or 26 to 754 of SEQ ID NO:2; a transmembrane domain from about amino acid 754 to 778 of SEQ ID NO:2; a C-terminal cytoplasmic domain from about amino acid 778 to 1118 of SEQ ID NO:2; a fibronectin type III domain from about amino acid 28 to 108, 119 to 201, 299 to 381, 388 to 469, 477 to 559, or 567 to 656 of SEQ ID NO:2; a protein-tyrosine phosphatase domain from about amino acid 846 to 1080, 977 to 1080, or 821 to 1083 of SEQ ID NO:2.

**[00121]** In another embodiment a set of primers is provided, *e.g.*, primers suitable for use in a PCR, which can be used to amplify a selected region of a MID 4460 sequence, *e.g.*, a domain, region, site or other sequence described herein. The primers should be at least 5, 10, or 50 base pairs in length and less than 100, or less than 200, base pairs in length. The primers should be identical, or differ by one base from a sequence disclosed herein or from a naturally occurring variant. For example, primers suitable for amplifying all or a portion of any of the following regions are provided: a cytoplasmic domain from about amino acid 778 to 1118 of SEQ ID NO:2; a transmembrane domain from about amino acid 754 to 778 of SEQ ID NO:2; an extracellular domain from about amino acid 1 to 754 or 26 to 754 of SEQ ID NO:2; a mature protein from about amino acid 26 to 1118 of SEQ ID NO:2; a protein tyrosine phosphatase domain from about amino acid 821 to 1083 of SEQ ID NO:2; a protein tyrosine phosphatase domain from about amino acid 977 to 1080 of SEQ ID NO:2; a protein tyrosine phosphatase domain from about amino acid 846 to 1080 of SEQ ID NO:2; a fibronectin type III domain from about amino acid 30 to 109, 119 to 198, 299 to 378, 388 to 467, 477 to 556, or 567 to 657 of SEQ ID NO:2.

**[00122]** A nucleic acid fragment can encode an epitope bearing region of a polypeptide described herein.

**[00123]** A nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of a MID 4460 polypeptide" can be prepared by isolating a portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 3, which encodes a polypeptide having a MID 4460 biological activity (*e.g.*, the biological activities of the MID 4460 proteins are described herein), expressing the encoded portion of the MID 4460 protein (*e.g.*, by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of the MID 4460 protein. For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of MID 4460 includes a protein tyrosine phosphatase domain, *e.g.*, amino acid residues about 846 to 1080 of SEQ ID NO:2. A

WO 03/025199

PCT/US02/29353

nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of a MID 4460 polypeptide, can comprise a nucleotide sequence which is greater than 300 or more nucleotides in length.

[00124] In preferred embodiments, a nucleic acid includes a nucleotide sequence which is about 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

#### MID 4460 Nucleic Acid Variants

[00125] The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. Such differences can be due to degeneracy of the genetic code and result in a nucleic acid which encodes the same MID 4460 proteins as those encoded by the nucleotide sequence disclosed herein. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence which differs, by at least 1, but less than 5, 10, 20, 50, or 100 amino acid residues that shown in SEQ ID NO:2. If alignment is needed for this comparison the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

[00126] Nucleic acids of the inventor can be chosen for having codons, which are preferred, or non-preferred, for a particular expression system. *E.g.*, the nucleic acid can be one in which at least one codon, at preferably at least 10%, or 20% of the codons has been altered such that the sequence is optimized for expression in *E. coli*, yeast, human, insect, or CHO cells.

[00127] Nucleic acid variants can be naturally occurring, such as allelic variants (same locus), homologs (different locus), and orthologs (different organism) or can be non naturally occurring. Non-naturally occurring variants can be made by mutagenesis techniques, including those applied to polynucleotides, cells, or organisms. The variants can contain nucleotide substitutions, deletions, inversions and insertions. Variation can occur in either or both the coding and non-coding regions. The variations can produce both conservative and non-conservative amino acid substitutions (as compared in the encoded product).

[00128] In a preferred embodiment, the nucleic acid differs from that of SEQ ID NO: 1 or 3, *e.g.*, as follows: by at least one but less than 10, 20, 30, or 40 nucleotides; at least one but less than 1%, 5%, 10%, or 20% of the nucleotides in the subject nucleic acid. If necessary for this

WO 03/025199

PCT/US02/29353

analysis the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.

[00129] Orthologs, homologs, and allelic variants can be identified using methods known in the art. These variants comprise a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is 50%, at least about 55%, typically at least about 70-75%, more typically at least about 80-85%, and most typically at least about 90-95% or more identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:2 or a fragment of this sequence. Such nucleic acid molecules can readily be identified as being able to hybridize under stringent conditions, to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO 2 or a fragment of the sequence. Nucleic acid molecules corresponding to orthologs, homologs, and allelic variants of the MID 4460 cDNAs of the invention can further be isolated by mapping to the same chromosome or locus as the MID 4460 gene.

[00130] Preferred variants include those that are correlated with the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphate ester bond of a substrate or the ability to bind a ligand.

[00131] Allelic variants of MID 4460, *e.g.*, human MID 4460, include both functional and non-functional proteins. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the MID 4460 protein within a population that maintain the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphate ester bond or to bind a ligand. 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 MID 4460, *e.g.*, human MID 4460, protein within a population that do not have the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphate ester bond or bind a ligand. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, a deletion, or insertion, or premature truncation of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a substitution, insertion, or deletion in critical residues or critical regions of the protein.

[00132] Moreover, nucleic acid molecules encoding other MID 4460 family members and, thus, which have a nucleotide sequence which differs from the MID 4460 sequences of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3 are intended to be within the scope of the invention.

Antisense Nucleic Acid Molecules, Ribozymes and Modified MID 4460 Nucleic Acid Molecules

[00133] In another aspect, the invention features, an isolated nucleic acid molecule which is antisense to MID 4460. An "antisense" nucleic acid can include 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

WO 03/025199

PCT/US02/29353

sequence. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire MID 4460 coding strand, or to only a portion thereof (*e.g.*, the coding region of human MID 4460 corresponding to SEQ ID NO:3). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding MID 4460 (*e.g.*, the 5' and 3' untranslated regions).

[00134] An antisense nucleic acid can be designed such that it is complementary to the entire coding region of MID 4460 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of MID 4460 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of MID 4460 mRNA, *e.g.*, between the -10 and +10 regions of the target gene nucleotide sequence of interest. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, or more nucleotides in length.

[00135] An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (*e.g.*, an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids, *e.g.*, phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used. The antisense nucleic acid also can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

[00136] The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject (*e.g.*, by direct injection at a tissue site), or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a MID 4460 protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically or selectively bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve

WO 03/025199

PCT/US02/29353

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.

[00137] In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule. An  $\alpha$ -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gaultier *et al.* (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). The antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue *et al.* (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue *et al.* (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

[00138] In still another embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. A ribozyme having specificity for a MID 4460-encoding nucleic acid can include one or more sequences complementary to the nucleotide sequence of a MID 4460 cDNA disclosed herein (i.e., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3), and a sequence having known catalytic sequence responsible for mRNA cleavage (see U.S. Pat. No. 5,093,246 or Haselhoff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591). For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a MID 4460-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, MID 4460 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel and Szostak (1993) *Science* 261:1411-1418.

[00139] MID 4460 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the MID 4460 (e.g., the MID 4460 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the MID 4460 gene in target cells. See generally, Helene (1991) *Anticancer Drug Des.* 6:569-84; Helene (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher (1992) *Bioassays* 14:807-15. The potential sequences that can be targeted for triple helix formation can be increased by creating a so-called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00140] The invention also provides detectably labeled oligonucleotide primer and probe molecules. Typically, such labels are chemiluminescent, fluorescent, radioactive, or colorimetric.

[00141] A MID 4460 nucleic acid molecule can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, *e.g.*, the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup *et al.* (1996) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4: 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acid" or "PNA" refers to a nucleic acid mimic, *e.g.*, a DNA mimic, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of a PNA can allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 14670-675.

[00142] PNAs of MID 4460 nucleic acid molecules can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of MID 4460 nucleic acid molecules can also be used in the analysis of single base pair mutations in a gene, (*e.g.*, by PNA-directed PCR clamping); as 'artificial restriction enzymes' when used in combination with other enzymes, (*e.g.*, S1 nucleases (Hyrup *et al.* (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup *et al.* (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *supra*).

[00143] In other embodiments, the oligonucleotide can include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (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 can be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00144] The invention also includes molecular beacon oligonucleotide primer and probe molecules having at least one region which is complementary to a MID 4460 nucleic acid of the invention, two complementary regions one having a fluorophore and one a quencher such that the molecular beacon is useful for quantitating the presence of the MID 4460 nucleic acid of the invention in a sample. Molecular beacon nucleic acids are described, for example, in *Lizardi et al.*, U.S. Patent No. 5,854,033; *Nazarenko et al.*, U.S. Patent No. 5,866,336, and *Livak et al.*, U.S. Patent 5,876,930.

Isolated MID 4460 Polypeptides

[00145] In another aspect, the invention features, an isolated MID 4460 protein, or fragment, *e.g.*, a biologically active portion, for use as immunogens or antigens to raise or test (or more generally to bind) anti-MID 4460 antibodies. MID 4460 protein can be isolated from cells or tissue sources using standard protein purification techniques. MID 4460 protein or fragments thereof can be produced by recombinant DNA techniques or synthesized chemically.

[00146] Polypeptides of the invention include those which arise as a result of the existence of multiple genes, alternative transcription events, alternative RNA splicing events, and alternative translational and post-translational events. The polypeptide can be expressed in systems, *e.g.*, cultured cells, which result in substantially the same post-translational modifications present when the polypeptide is expressed in a native cell, or in systems which result in the alteration or omission of post-translational modifications, *e.g.*, glycosylation or cleavage, present in a native cell.

[00147] In a preferred embodiment, a MID 4460 polypeptide has one or more of the following characteristics:

[00148] it has the ability to catalyze the hydrolysis of a phosphate ester bond, bind a ligand, dephosphorylate the MID 4460 target protein, transduce a signal, elevate HDL levels, decrease LDL levels, and reduce atherosclerosis;

[00149] it has a molecular weight, *e.g.*, a deduced molecular weight, preferably ignoring any contribution of post translational modifications, amino acid composition or other physical characteristic of a MID 4460 polypeptide, *e.g.*, a polypeptide of SEQ ID NO:2;

[00150] it has an overall sequence similarity of at least 60%, preferably at least 70%, more preferably at least 80, 90, or 95%, with a polypeptide of SEQ ID NO:2;

[00151] it is expressed in at least the following human tissues and cell lines: at high levels in liver and colon, at medium levels in heart, pancreas, brain, spleen, and small intestines;

WO 03/025199

PCT/US02/29353

- [00152] it has a protein tyrosine phosphatase domain which is preferably about 70%, 80%, 90% or 95% identical to amino acid residues about 846 to 1080 of SEQ ID NO:2;
- [00153] it has a fibronectin type III domain which is preferably about 70%, 80%, 90% or 95% identical to amino acid residues about 28 to 108, 119 to 201, 299 to 381, 388 to 469, 477 to 559, or 567 to 656 of SEQ ID NO:2; and
- [00154] it has at least one, two, three, four, five, six, seven, eight, nine, ten, eleven, twelve, thirteen, fourteen, fifteen, sixteen, seventeen, preferably eighteen, and most preferably nineteen of the cysteines found in the amino acid sequence of the native protein.
- [00155] In a preferred embodiment the MID 4460 protein, or fragment thereof, differs from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2. In one embodiment it differs by at least one but by less than 15, 10 or 5 amino acid residues. In another it differs from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2 by at least one residue but less than 20%, 15%, 10% or 5% of the residues in it differ from the corresponding sequence in SEQ ID NO:2. (If this comparison requires alignment the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.) The differences are, preferably, differences or changes at a non-essential residue or a conservative substitution. In a preferred embodiment the differences are not in the protein-tyrosine phosphatase domain at about residues 846 to 1080 of SEQ ID NO:2; the fibronectin type III domain at about residues 28 to 108, 119 to 201, 299 to 381, 388 to 469, 477 to 559, or 567 to 656 of SEQ ID NO:2; the transmembrane domain at about residues 754 to 778 of SEQ ID NO:2; the extracellular domain at about residues 1 to 754 of SEQ ID NO:2; or the intracellular domain at about residues 778 to 1118 of SEQ ID NO:2. In another embodiment one or more differences are in the protein-tyrosine phosphatase domain at about residues 846 to 1080 of SEQ ID NO:2; the fibronectin type III domain at about residues 28 to 108, 119 to 201, 299 to 381, 388 to 469, 477 to 559, 567 to 656 of SEQ ID NO:2; the transmembrane domain at about residues 754 to 778 of SEQ ID NO:2; the extracellular domain at about residues 1 to 754 of SEQ ID NO:2; or the intracellular domain at about residues 778 to 1118 of SEQ ID NO:2.
- [00156] Other embodiments include a protein that contains one or more changes in amino acid sequence, *e.g.*, a change in an amino acid residue which is not essential for activity. Such MID 4460 proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2, yet retain biological activity.
- [00157] In one embodiment, the protein includes an amino acid sequence at least about 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% or more homologous to SEQ ID NO:2.



WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00158] A MID 4460 protein or fragment is provided which varies from the sequence of SEQ ID NO:2 in regions defined by amino acids about 1 to 846 or 1080 to 1118 by at least one but by less than 15, 10 or 5 amino acid residues in the protein or fragment but which does not differ from SEQ ID NO:2 in regions defined by amino acids about 846 to 1080. (If this comparison requires alignment the sequences should be aligned for maximum homology. "Looped" out sequences from deletions or insertions, or mismatches, are considered differences.) In some embodiments the difference is at a non-essential residue or is a conservative substitution, while in others the difference is at an essential residue or is a non-conservative substitution.

[00159] In one embodiment, a biologically active portion of a MID 4460 protein includes a protein-tyrosine phosphatase domain. Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native MID 4460 protein.

[00160] In a preferred embodiment, the MID 4460 protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. In other embodiments, the MID 4460 protein is sufficiently or substantially identical to SEQ ID NO:2. In yet another embodiment, the MID 4460 protein is sufficiently or substantially identical to SEQ ID NO:2 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, as described in detail in the subsections above.

#### MID 4460 Chimeric or Fusion Proteins

[00161] In another aspect, the invention provides MID 4460 chimeric or fusion proteins. As used herein, a MID 4460 "chimeric protein" or "fusion protein" includes a MID 4460 polypeptide linked to a non-MID 4460 polypeptide. A "non-MID 4460 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the MID 4460 protein, *e.g.*, a protein which is different from the MID 4460 protein and which is derived from the same or a different organism. The MID 4460 polypeptide of the fusion protein can correspond to all or a portion *e.g.*, a fragment described herein of a MID 4460 amino acid sequence. In a preferred embodiment, a MID 4460 fusion protein includes at least one (or two) biologically active portion of a MID 4460 protein. The non-MID 4460 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the MID 4460 polypeptide.

[00162] The fusion protein can include a moiety which has a high affinity for a ligand. For example, the fusion protein can be a GST-MID 4460 fusion protein in which the MID 4460 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can

WO 03/025199

PCT/US02/29353

facilitate the purification of recombinant MID 4460. Alternatively, the fusion protein can be a MID 4460 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of MID 4460 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

[00163] Fusion proteins can include all or a part of a serum protein, *e.g.*, a portion of an immunoglobulin (*e.g.*, IgG, IgA, or IgE), *e.g.*, an Fc region and/or the hinge C1 and C2 sequences of an immunoglobulin or human serum albumin.

[00164] The MID 4460 fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The MID 4460 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a MID 4460 substrate. MID 4460 fusion proteins can be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a MID 4460 protein; (ii) mis-regulation of the MID 4460 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a MID 4460 protein.

[00165] Moreover, the MID 4460-fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-MID 4460 antibodies in a subject, to purify MID 4460 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of MID 4460 with a MID 4460 substrate.

[00166] Expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A MID 4460-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the MID 4460 protein.

#### Variants of MID 4460 Proteins

[00167] In another aspect, the invention also features a variant of a MID 4460 polypeptide, *e.g.*, which functions as an agonist (mimetics) or as an antagonist. Variants of the MID 4460 proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation, the insertion or deletion of sequences or the truncation of a MID 4460 protein. An agonist of the MID 4460 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a MID 4460 protein. An antagonist of a MID 4460 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the MID 4460 protein by, for example, competitively modulating a MID 4460-mediated activity of a MID 4460 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. Preferably, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological

WO 03/025199

PCT/US02/29353

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 MID 4460 protein.

[00168] Variants of a MID 4460 protein can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a MID 4460 protein for agonist or antagonist activity.

[00169] Libraries of fragments *e.g.*, N terminal, C terminal, or internal fragments, of a MID 4460 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of fragments for screening and subsequent selection of variants of a MID 4460 protein.

[00170] Variants in which a cysteine residues is added or deleted or in which a residue which is glycosylated is added or deleted are particularly preferred.

[00171] Methods for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property are known in the art. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify MID 4460 variants (Arkin and Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6:327-331).

[00172] Cell based assays can be exploited to analyze a variegated MID 4460 library. For example, a library of expression vectors can be transfected into a cell line, *e.g.*, a cell line, which ordinarily responds to MID 4460 in a substrate-dependent manner. The transfected cells are then contacted with MID 4460 and the effect of the expression of the mutant on signaling by the MID 4460 substrate can be detected, *e.g.*, by measuring the hydrolysis of a phosphate ester bond in a substrate such as a peptide or protein. Plasmid DNA can then be recovered from the cells which score for inhibition, or alternatively, potentiation of signaling by the MID 4460 substrate, and the individual clones further characterized.

[00173] In another aspect, the invention features a method of making a MID 4460 polypeptide, *e.g.*, a peptide having a non-wild type activity, *e.g.*, an antagonist, agonist, or super agonist of a naturally occurring MID 4460 polypeptide, *e.g.*, a naturally occurring MID 4460 polypeptide. The method includes altering the sequence of a MID 4460 polypeptide, *e.g.*, altering the sequence, *e.g.*, by substitution or deletion of one or more residues of a non-conserved region, a domain or residue disclosed herein, and testing the altered polypeptide for the desired activity.

[00174] In another aspect, the invention features a method of making a fragment or analog of a MID 4460 polypeptide a biological activity of a naturally occurring MID 4460

WO 03/025199

PCT/US02/29353

polypeptide. The method includes altering the sequence, *e.g.*, by substitution or deletion of one or more residues, of a MID 4460 polypeptide, *e.g.*, altering the sequence of a non-conserved region, or a domain or residue described herein, and testing the altered polypeptide for the desired activity.

#### Anti-MID 4460 Antibodies

[00175] In another aspect, the invention provides an anti-MID 4460 antibody. The term "antibody" as used herein refers to an immunoglobulin molecule or immunologically active portion thereof, *i.e.*, an antigen-binding portion. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include scFV and dcFV fragments, Fab and F(ab)<sub>2</sub> fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as papain or pepsin, respectively.

[00176] The antibody can be a polyclonal, monoclonal, recombinant, *e.g.*, a chimeric or humanized, fully human, non-human, *e.g.*, murine, or single chain antibody. In a preferred embodiment it has effector function and can fix complement. The antibody can be coupled to a toxin or imaging agent.

[00177] A full-length MID 4460 protein or, antigenic peptide fragment of MID 4460 can be used as an immunogen or can be used to identify anti-MID 4460 antibodies made with other immunogens, *e.g.*, cells, membrane preparations, and the like. The antigenic peptide of MID 4460 should include at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of MID 4460. Preferably, the antigenic peptide includes at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

[00178] Fragments of MID 4460 which include residues about 65 to 85, from about 140 to 175, from about 190 to 225, from about 230 to 240, from about 250 to 265, from about 315 to 350, from about 365 to 395, from about 402 to 422, from about 420 to 435, from about 450 to 470, from about 480 to 488, from about 495 to 505, from about 510 to 525, from about 540 to 558, from about 561 to 580, from about 595 to 630, from about 700 to 715, from about 773 to 790, from about 800 to 818, from about 835 to 855, from about 921 to 945, from about 995 to 1015, and from about 1075 to 1118 of SEQ ID NO:2 can be used to make, *e.g.*, used as immunogens or used to characterize the specificity of an antibody, antibodies against hydrophilic regions of the MID 4460 protein (see Figure 2). Similarly, fragments of MID 4460 which include residues about 1 to 25, from about 85 to 100, from about 355 to 365,

WO 03/025199

PCT/US02/29353

from about 710 to 720, from about 750 to 775, or about 1020 to 1040 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against a hydrophobic region of the MID 4460 protein; fragments of MID 4460 which include residues about 1 to 754, or a subset thereof, *e.g.* about residues 1 to 25, about residues 28 to 108, about residues 119 to 201, about residues 299 to 381, about residues 388 to 469, about residues 477 to 559, about residues 567 to 656, about residues 656 to 754 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against an extracellular region of the MID 4460 protein; fragments of MID 4460 which includes residues about 778 to 1118, about 846 to 1080, about 977 to 1080, or about 821 to 1083 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against an intracellular region of the MID 4460 protein; a fragment of MID 4460 which includes residues about 977 to 1080, about 821 to 1083, or about 846 to 1080 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against the protein-tyrosine phosphatase region of the MID 4460 protein; a fragment of MID 4460 which includes residues about 754 to 778 of SEQ ID NO:2 can be used to make an antibody against the transmembrane domain of the MID 4460 protein.

**[00179]** Antibodies reactive with, or specific or selective for, any of these regions, or other regions or domains described herein are provided.

**[00180]** Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of MID 4460 located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity. For example, an Emmini surface probability analysis of the human MID 4460 protein sequence can be used to indicate the regions that have a particularly high probability of being localized to the surface of the MID 4460 protein and are thus likely to constitute surface residues useful for targeting antibody production.

**[00181]** In a preferred embodiment the antibody can bind to the extracellular portion of the MID 4460 protein, *e.g.*, it can bind to a whole cell which expresses the MID 4460 protein. In another embodiment, the antibody binds an intracellular portion of the MID 4460 protein.

**[00182]** In a preferred embodiment the antibody binds an epitope on any domain or region on MID 4460 proteins described herein.

**[00183]** Additionally, chimeric, humanized, and completely human antibodies are also within the scope of the invention. Chimeric, humanized, but most preferably, completely human antibodies are desirable for applications which include repeated administration, *e.g.*, therapeutic treatment of human patients, and some diagnostic applications.

**[00184]** Chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, can be made using standard recombinant DNA techniques. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA

WO 03/025199

PCT/US02/29353

techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559).

**[00185]** A humanized or complementarity determining region (CDR)-grafted antibody will have at least one or two, but generally all three recipient CDR's (of heavy and or light immunoglobulin chains) replaced with a donor CDR. The antibody may be replaced with at least a portion of a non-human CDR or only some of the CDR's may be replaced with non-human CDR's. It is only necessary to replace the number of CDR's required for binding of the humanized antibody to a MID 4460 or a fragment thereof. Preferably, the donor will be a rodent antibody, *e.g.*, a rat or mouse antibody, and the recipient will be a human framework or a human consensus framework. Typically, the immunoglobulin providing the CDR's is called the "donor" and the immunoglobulin providing the framework is called the "acceptor." In one embodiment, the donor immunoglobulin is a non-human (*e.g.*, rodent). The acceptor framework is a naturally-occurring (*e.g.*, a human) framework or a consensus framework, or a sequence about 85% or higher, preferably 90%, 95%, 99% or higher identical thereto.

**[00186]** As used herein, the term "consensus sequence" refers to the sequence formed from the most frequently occurring amino acids (or nucleotides) in a family of related sequences (See *e.g.*, Winnaker, (1987) *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany). In a family of proteins, each position in the consensus sequence is occupied by the amino acid occurring most frequently at that position in the family. If two amino acids occur equally frequently, either can be included in the consensus sequence. A "consensus framework" refers to the framework region in the consensus immunoglobulin sequence.

**[00187]** An antibody can be humanized by methods known in the art. Humanized antibodies can be generated by replacing sequences of the Fv variable region which are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207, by Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214, and by Queen *et al.*

WO 03/025199

PCT/US02/29353

US patent Nos. 5,585,089, 5,693,761 and 5,693,762, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Those methods include isolating, manipulating, and expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable regions from at least one of a heavy or light chain. Sources of such nucleic acid are well known to those skilled in the art and, for example, may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a MID 4460 polypeptide or fragment thereof. The recombinant DNA encoding the humanized antibody, or fragment thereof, can then be cloned into an appropriate expression vector.

[00188] Humanized or CDR-grafted antibodies can be produced by CDR-grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDR's of an immunoglobulin chain can be replaced. See *e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US patent No. 5,225,539, the contents of all of which are hereby expressly incorporated by reference. Winter describes a CDR-grafting method which may be used to prepare the humanized antibodies of the present invention (UK Patent Application GB 2188638A, filed on March 26, 1987; Winter U.S. patent No. 5,225,539), the contents of which is expressly incorporated by reference.

[00189] Also within the scope of the invention are humanized antibodies in which specific amino acids have been substituted, deleted or added. Preferred humanized antibodies have amino acid substitutions in the framework region, such as to improve binding to the antigen. For example, a humanized antibody will have framework residues identical to the donor framework residue or to another amino acid other than the recipient framework residue. To generate such antibodies, a selected, small number of acceptor framework residues of the humanized immunoglobulin chain can be replaced by the corresponding donor amino acids. Preferred locations of the substitutions include amino acid residues adjacent to the CDR, or which are capable of interacting with a CDR (see *e.g.*, US patent No. 5,585,089). Criteria for selecting amino acids from the donor are described in US 5,585,089, *e.g.*, columns 12-16 of US 5,585,089, the *e.g.*, columns 12-16 of US 5,585,089, the contents of which are hereby incorporated by reference. Other techniques for humanizing antibodies are described in Padlan *et al.* EP 519596 A1, published on December 23, 1992.

[00190] Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients. Such antibodies can be produced using transgenic mice that are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. See, for example, Lonberg and Huszar (1995)

WO 03/025199

PCT/US02/29353

*Int. Rev. Immunol.* 13:65-93); and U.S. Patent Nos. 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; and 5,545,806. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and Medarex, Inc. (Princeton, NJ), can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

**[00191]** Completely human antibodies that recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, *e.g.*, a murine antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. This technology is described by Jespers *et al.* (1994) *BioTechnology* 12:899-903).

**[00192]** The anti-MID 4460 antibody can be a single chain antibody. A single-chain antibody (scFV) can be engineered as described in, for example, Colcher *et al.* (1999) *Ann. N Y Acad. Sci.* 880:263-80; and Reiter (1996) *Clin. Cancer Res.* 2:245-52. The single chain antibody can be dimerized or multimerized to generate multivalent antibodies having specificities for different epitopes of the same target MID 4460 protein.

**[00193]** In a preferred embodiment, the antibody has reduced or no ability to bind an Fc receptor. For example, it is an isotype or subtype, fragment or other mutant, which does not support binding to an Fc receptor, *e.g.*, it has a mutagenized or deleted Fc receptor binding region.

**[00194]** An antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, teniposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, puromycin, maytansinoids, *e.g.*, maytansinol (see US Patent No. 5,208,020), CC-1065 (see US Patent Nos. 5,475,092, 5,585,499, 5,846,545) and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, CC-1065, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclophosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)),



WO 03/025193

PCT/US02/29353

and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine, vinblastine, taxol and maytansinoids). Radioactive ions include, but are not limited to iodine, yttrium and praseodymium.

[00195] The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the therapeutic moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the therapeutic moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor,  $\alpha$ -interferon,  $\beta$ -interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, 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.

[00196] Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980.

[00197] An anti-MID 4460 antibody (*e.g.*, monoclonal antibody) can be used to isolate MID 4460 by standard techniques, such as affinity chromatography or immunoprecipitation. Moreover, an anti-MID 4460 antibody can be used to detect MID 4460 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the protein. Anti-MID 4460 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance (*i.e.*, antibody labelling). Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , or  $^3\text{H}$ .

[00198] In preferred embodiments, an antibody can be made by immunizing with a purified MID 4460 antigen, or a fragment thereof, *e.g.*, a fragment described herein, a

WO 03/025199

PCT/US02/29353

membrane associated antigen, tissues, *e.g.*, crude tissue preparations, whole cells, preferably living cells, lysed cells, or cell fractions, *e.g.*, membrane fractions.

[00199] Antibodies which bind only a native MID 4460 protein, only denatured or otherwise non-native MID 4460 protein, or which bind both, are within the invention. Antibodies with linear or conformational epitopes are within the invention. Conformational epitopes sometimes can be identified by identifying antibodies which bind to native but not denatured MID 4460 protein.

Recombinant Expression Vectors, Host Cells and Genetically Engineered Cells

[00200] In another aspect, the invention includes, vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a polypeptide described herein. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked and can include a plasmid, cosmid or viral vector. The vector can be capable of autonomous replication or it can integrate into a host DNA. Viral vectors include, *e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses.

[00201] A vector can include a MID 4460 nucleic acid in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell. Preferably the recombinant expression vector includes one or more regulatory sequences operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. The term "regulatory sequence" includes promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals). Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence, as well as tissue-specific regulatory and/or inducible sequences. The design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or polypeptides, including fusion proteins or polypeptides, encoded by nucleic acids as described herein (*e.g.*, MID 4460 proteins, mutant forms of MID 4460 proteins, fusion proteins, and the like).

[00202] The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of MID 4460 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, polypeptides of the invention can be expressed in *E. coli*, insect cells (*e.g.*, using baculovirus expression vectors), yeast cells or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA. Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed

WO 03/025199

PCT/US02/29353

and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

[00203] Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: 1) to increase expression of recombinant protein; 2) to increase the solubility of the recombinant protein; and 3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as a ligand in affinity purification. Often, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) which fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

[00204] Purified fusion proteins can be used in MID 4460 activity assays, (*e.g.*, direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific or selective for MID 4460 proteins. In a preferred embodiment, a fusion protein expressed in a retroviral expression vector of the present invention can be used to infect bone marrow cells which are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (*e.g.*, six weeks).

[00205] To maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant protein (Gottesman (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California 119-128). Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (Wada *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

[00206] The MID 4460 expression vector can be a yeast expression vector, a vector for expression in insect cells, *e.g.*, a baculovirus expression vector or a vector suitable for expression in mammalian cells.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00207] 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.

[00208] In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (e.g., tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev.* 1:268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J.* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (e.g., the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund *et al.* (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (e.g., milk whey promoter; U.S. Patent No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, for example, the murine hox promoters (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) and the  $\alpha$ -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

[00209] The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. Regulatory sequences (e.g., viral promoters and/or enhancers) operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA in a variety of cell types. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes see Weintraub *et al.*, (1986) *Reviews - Trends in Genetics* 1:1.

[00210] Another aspect the invention provides a host cell which includes a nucleic acid molecule described herein, e.g., a MID 4460 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a MID 4460 nucleic acid molecule containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. Such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications can occur in succeeding generations due to either mutation or

WO 03/025199

PCT/US02/29353

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.

[00211] A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a MID 4460 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary (CHO) cells or CV-1 origin, SV-40 (COS) cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

[00212] Vector DNA can be introduced into host cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and "transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (*e.g.*, DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation.

[00213] A host cell of the invention can be used to produce (*i.e.*, express) a MID 4460 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a MID 4460 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method includes culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding a MID 4460 protein has been introduced) in a suitable medium such that a MID 4460 protein is produced. In another embodiment, the method further includes isolating a MID 4460 protein from the medium or the host cell.

[00214] In another aspect, the invention features, a cell or purified preparation of cells which include a MID 4460 transgene, or which otherwise misexpress MID 4460. The cell preparation can consist of human or non-human cells, *e.g.*, rodent cells, *e.g.*, mouse or rat cells, rabbit cells, or pig cells. In preferred embodiments, the cell or cells include a MID 4460 transgene, *e.g.*, a heterologous form of a MID 4460, *e.g.*, a gene derived from humans (in the case of a non-human cell). The MID 4460 transgene can be misexpressed, *e.g.*, overexpressed or underexpressed. In other preferred embodiments, the cell or cells include a gene which misexpresses an endogenous MID 4460, *e.g.*, a gene the expression of which is disrupted, *e.g.*, a knockout. Such cells can serve as a model for studying disorders which are related to mutated or misexpressed MID 4460 alleles or for use in drug screening.

[00215] In another aspect, the invention features, a human cell, *e.g.*, a hematopoietic stem cell, transformed with nucleic acid which encodes a subject MID 4460 polypeptide.

[00216] Also provided are cells, preferably human cells, *e.g.*, human hematopoietic or fibroblast cells, in which an endogenous MID 4460 is under the control of a regulatory sequence that does not normally control the expression of the endogenous MID 4460 gene. The expression characteristics of an endogenous gene within a cell, *e.g.*, a cell line or

WO 03/025199

PCT/US02/29353

microorganism, can be modified by inserting a heterologous DNA regulatory element into the genome of the cell such that the inserted regulatory element is operably linked to the endogenous MID 4460 gene. For example, an endogenous MID 4460 gene which is "transcriptionally silent," *e.g.*, not normally expressed, or expressed only at very low levels, can be activated by inserting a regulatory element which is capable of promoting the expression of a normally expressed gene product in that cell. Techniques such as targeted homologous recombinations, can be used to insert the heterologous DNA as described in, *e.g.*, Chappel, US 5,272,071; WO 91/06667, published in May 16, 1991.

#### Transgenic Animals

**[00217]** The invention provides non-human transgenic animals. Such animals are useful for studying the function and/or activity of a MID 4460 protein and for identifying and/or evaluating modulators of MID 4460 activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, and the like. A transgene is exogenous DNA or a rearrangement, *e.g.*, a deletion of endogenous chromosomal DNA, which preferably is integrated into or occurs in the genome of the cells of a transgenic animal. A transgene can direct the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal, other transgenes, *e.g.*, a knockout, reduce expression. Thus, a transgenic animal can be one in which an endogenous MID 4460 gene has been altered by, *e.g.*, by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a cell of the animal, *e.g.*, an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

**[00218]** Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably linked to a transgene of the invention to direct expression of a MID 4460 protein to particular cells. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of a MID 4460 transgene in its genome and/or expression of MID 4460 mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene encoding a MID 4460 protein can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00219] MID 4460 proteins or polypeptides can be expressed in transgenic animals or plants, *e.g.*, a nucleic acid encoding the protein or polypeptide can be introduced into the genome of an animal. In preferred embodiments the nucleic acid is placed under the control of a tissue specific promoter, *e.g.*, a milk or egg specific promoter, and recovered from the milk or eggs produced by the animal. Suitable animals are mice, pigs, cows, goats, and sheep.

[00220] The invention also includes a population of cells from a transgenic animal, as discussed, *e.g.*, below.

#### Uses

[00221] The nucleic acid molecules, proteins, protein homologs, and antibodies described herein can be used in one or more of the following methods: a) screening assays; b) predictive medicine (*e.g.*, diagnostic assays, prognostic assays, monitoring clinical trials, and pharmacogenetics); and c) methods of treatment (*e.g.*, therapeutic and prophylactic).

[00222] The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used, for example, to express a MID 4460 protein (*e.g.*, via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to detect a MID 4460 mRNA (*e.g.*, in a biological sample) or a genetic alteration in a MID 4460 gene, and to modulate MID 4460 activity, as described further below. The MID 4460 proteins can be used to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of a MID 4460 substrate or production of MID 4460 inhibitors. In addition, the MID 4460 proteins can be used to screen for naturally occurring MID 4460 substrates, to screen for drugs or compounds which modulate MID 4460 activity, as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of MID 4460 protein or production of MID 4460 protein forms which have decreased, aberrant or unwanted activity compared to MID 4460 wild type protein (*e.g.*, aberrant or deficient phosphatase function or expression). Moreover, the anti-MID 4460 antibodies of the invention can be used to detect and isolate MID 4460 proteins, regulate the bioavailability of MID 4460 proteins, and modulate MID 4460 activity.

[00223] A method of evaluating a compound for the ability to interact with, *e.g.*, bind, a subject MID 4460 polypeptide is provided. The method includes: contacting the compound with the subject MID 4460 polypeptide; and evaluating ability of the compound to interact with, *e.g.*, to bind or form a complex with the subject MID 4460 polypeptide. This method can be performed *in vitro*, *e.g.*, in a cell free system, or *in vivo*, *e.g.*, in a two-hybrid interaction trap assay. This method can be used to identify naturally occurring molecules

WO 03/025199

PCT/US02/29353

which interact with subject MID 4460 polypeptide. It can also be used to find natural or synthetic inhibitors of subject MID 4460 polypeptide. Screening methods are discussed in more detail below.

Screening Assays:

**[00224]** The invention provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, i.e., candidate or test compounds or agents (e.g., proteins, peptides, peptidomimetics, peptoids, small molecules or other drugs) which bind to MID 4460 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, MID 4460 expression or MID 4460 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on, for example, the expression or activity of a MID 4460 substrate. Compounds thus identified can be used to modulate the activity of target gene products (e.g., MID 4460 genes) in a therapeutic protocol, to elaborate the biological function of the target gene product, or to identify compounds that disrupt normal target gene interactions.

**[00225]** In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which are substrates of a MID 4460 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof. In another embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of a MID 4460 protein or polypeptide or a biologically active portion thereof.

**[00226]** The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; peptoid libraries (libraries of molecules having the functionalities of peptides, but with a novel, non-peptide backbone which are resistant to enzymatic degradation but which nevertheless remain bioactive; see, e.g., Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85); spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library and peptoid library approaches are limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

**[00227]** Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6909-13; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-426; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed.*



WO 03/025199

PCT/US02/29353

*Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and in Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51.

[00228] Libraries of compounds can be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner, USP 5,223,409), spores (Ladner USP '409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) or on phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra.*).

[00229] In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a MID 4460 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate MID 4460 activity is determined.

Determining the ability of the test compound to modulate MID 4460 activity can be accomplished by monitoring, for example, the hydrolysis of a phosphate ester of a substrate of MID 4460. The cell, for example, can be of mammalian origin, *e.g.*, human.

[00230] The ability of the test compound to modulate MID 4460 binding to a compound, *e.g.*, a MID 4460 substrate, or to bind to MID 4460 can also be evaluated. This can be accomplished, for example, by coupling the compound, *e.g.*, the substrate, with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound, *e.g.*, the substrate, to MID 4460 can be determined by detecting the labeled compound, *e.g.*, substrate, in a complex. Alternatively, MID 4460 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate MID 4460 binding to a MID 4460 substrate in a complex. For example, compounds (*e.g.*, MID 4460 substrates) can be labeled with <sup>125</sup>I, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S or <sup>3</sup>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 appropriate substrate to product.

[00231] The ability of a compound (*e.g.*, a MID 4460 substrate) to interact with MID 4460 with or without the labeling of any of the interactants can be evaluated. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with MID 4460 without the labeling of either the compound or the MID 4460. McConnell *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912. As used herein, a "microphysiometer" (*e.g.*, Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a

WO 03/025199

PCT/US02/29353

light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and MID 4460.

[00232] In yet another embodiment, a cell-free assay is provided in which a MID 4460 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to the MID 4460 protein or biologically active portion thereof is evaluated. Preferred biologically active portions of the MID 4460 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-MID 4460 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores.

[00233] Soluble and/or membrane-bound forms of isolated proteins (*e.g.*, MID 4460 proteins or biologically active portions thereof) can be used in the cell-free assays of the invention. When membrane-bound forms of the protein are used, it may be desirable to utilize a solubilizing agent. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)<sub>n</sub>, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamminio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamminio]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO), or N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate.

[00234] Cell-free assays involve preparing a reaction mixture of the target gene protein and the test compound under conditions and for a time sufficient to allow the two components to interact and bind, thus forming a complex that can be removed and/or detected.

[00235] The interaction between two molecules can also be detected, *e.g.*, using fluorescence energy transfer (FET) (see, for example, Lakowicz *et al.*, U.S. Patent No. 5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, U.S. Patent No. 4,868,103). A fluorophore label on the first, 'donor' molecule is selected such that its emitted fluorescent energy will be absorbed by a fluorescent label on a second, 'acceptor' molecule, which in turn is able to fluoresce due to the absorbed energy. Alternately, the 'donor' protein molecule can simply utilize the natural fluorescent energy of tryptophan residues. Labels are chosen that emit different wavelengths of light, such that the 'acceptor' molecule label can be differentiated from that of the 'donor'. Since the efficiency of energy transfer between the labels is related to the distance separating the molecules, the spatial relationship between the molecules can be assessed. In a situation in which binding occurs between the molecules, the fluorescent emission of the 'acceptor' molecule label in the assay should be maximal. An FET binding event can be conveniently

WO 03/025199

PCT/US02/29353

measured through standard fluorometric detection means well known in the art (*e.g.*, using a fluorimeter).

[00236] In another embodiment, determining the ability of the MID 4460 protein to bind to a target molecule can be accomplished using real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (see, *e.g.*, Sjolander and Urbaniczky (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345 and Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). "Surface plasmon resonance" or "BIA" detects biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore). Changes in the mass at the binding surface (indicative of a binding event) result in alterations of the refractive index of light near the surface (the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR)), resulting in a detectable signal which can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

[00237] In one embodiment, the target gene product or the test substance is anchored onto a solid phase. The target gene product/test compound complexes anchored on the solid phase can be detected at the end of the reaction. Preferably, the target gene product can be anchored onto a solid surface, and the test compound, (which is not anchored), can be labeled, either directly or indirectly, with detectable labels discussed herein.

[00238] It may be desirable to immobilize either MID 4460, an anti-MID 4460 antibody or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to a MID 4460 protein, or interaction of a MID 4460 protein with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided which adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, glutathione-S-transferase/MID 4460 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or MID 4460 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of MID 4460 binding or activity determined using standard techniques.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00239] Other techniques for immobilizing either a MID 4460 protein or a target molecule on matrices include using conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated MID 4460 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).

[00240] In order to conduct the assay, the non-immobilized component is added to the coated surface containing the anchored component. After the reaction is complete, unreacted components are removed (e.g., by washing) under conditions such that any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. The detection of complexes anchored on the solid surface can be accomplished in a number of ways. Where the previously non-immobilized component is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the previously non-immobilized component is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; e.g., using a labeled antibody specific or selective for the immobilized component (the antibody, in turn, can be directly labeled or indirectly labeled with, e.g., a labeled anti-Ig antibody).

[00241] In one embodiment, this assay is performed utilizing antibodies reactive with MID 4460 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the MID 4460 protein to its target molecule. Such antibodies can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or MID 4460 protein trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the MID 4460 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the MID 4460 protein or target molecule.

[00242] Alternatively, cell free assays can be conducted in a liquid phase. In such an assay, the reaction products are separated from unreacted components, by any of a number of standard techniques, including but not limited to: differential centrifugation (see, for example, Rivas and Minton (1993) *Trends Biochem Sci* 18:284-7); chromatography (gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography); electrophoresis (see, e.g., Ausubel *et al.*, eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York.); and immunoprecipitation (see, for example, Ausubel *et al.*, eds. (1999) *Current Protocols in Molecular Biology*, J. Wiley, New York). Such resins and chromatographic techniques are known to one skilled in the art (see, e.g., Heegaard (1998) *J Mol Recognit* 11:141-8; Hage and Tweed (1997) *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 699:499-525). Further, fluorescence

WO 03/025199

PCT/US02/29353

energy transfer can also be conveniently utilized, as described herein, to detect binding without further purification of the complex from solution.

[00243] In a preferred embodiment, the assay includes contacting the MID 4460 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds MID 4460 to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a MID 4460 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a MID 4460 protein includes determining the ability of the test compound to preferentially bind to MID 4460 or biologically active portion thereof, or to modulate the activity of a target molecule, as compared to the known compound.

[00244] The target gene products of the invention can, *in vivo*, interact with one or more cellular or extracellular macromolecules, such as proteins. For the purposes of this discussion, such cellular and extracellular macromolecules are referred to herein as "binding partners." Compounds that disrupt such interactions can be useful in regulating the activity of the target gene product. Such compounds can include, but are not limited to molecules such as antibodies, peptides, and small molecules. The preferred target genes/products for use in this embodiment are the MID 4460 genes herein identified. In an alternative embodiment, the invention provides methods for determining the ability of the test compound to modulate the activity of a MID 4460 protein through modulation of the activity of a downstream effector of a MID 4460 target molecule. For example, the activity of the effector molecule on an appropriate target can be determined, or the binding of the effector to an appropriate target can be determined, as previously described.

[00245] To identify compounds that interfere with the interaction between the target gene product and its cellular or extracellular binding partner(s), a reaction mixture containing the target gene product and the binding partner is prepared, under conditions and for a time sufficient, to allow the two products to form complex. In order to test an inhibitory agent, the reaction mixture is provided in the presence and absence of the test compound. The test compound can be initially included in the reaction mixture, or can be added at a time subsequent to the addition of the target gene and its cellular or extracellular binding partner. Control reaction mixtures are incubated without the test compound or with a placebo. The formation of any complexes between the target gene product and the cellular or extracellular binding partner is then detected. The formation of a complex in the control reaction, but not in the reaction mixture containing the test compound, indicates that the compound interferes with the interaction of the target gene product and the interactive binding partner.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Additionally, complex formation within reaction mixtures containing the test compound and normal target gene product can also be compared to complex formation within reaction mixtures containing the test compound and mutant target gene product. This comparison can be important in those cases wherein it is desirable to identify compounds that disrupt interactions of mutant but not normal target gene products.

**[00246]** These assays can be conducted in a heterogeneous or homogeneous format.

Heterogeneous assays involve anchoring either the target gene product or the binding partner onto a solid phase, and detecting complexes anchored on the solid phase at the end of the reaction. In homogeneous assays, the entire reaction is carried out in a liquid phase. In either approach, the order of addition of reactants can be varied to obtain different information about the compounds being tested. For example, test compounds that interfere with the interaction between the target gene products and the binding partners, *e.g.*, by competition, can be identified by conducting the reaction in the presence of the test substance.

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

**[00247]** In a heterogeneous assay system, either the target gene product or the interactive cellular or extracellular binding partner, is anchored onto a solid surface (*e.g.*, a microtiter plate), while the non-anchored species is labeled, either directly or indirectly. The anchored species can be immobilized by non-covalent or covalent attachments. Alternatively, an immobilized antibody specific or selective for the species to be anchored can be used to anchor the species to the solid surface.

**[00248]** In order to conduct the assay, the partner of the immobilized species is exposed to the coated surface with or without the test compound. After the reaction is complete, unreacted components are removed (*e.g.*, by washing) and any complexes formed will remain immobilized on the solid surface. Where the non-immobilized species is pre-labeled, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexes were formed. Where the non-immobilized species is not pre-labeled, an indirect label can be used to detect complexes anchored on the surface; *e.g.*, using a labeled antibody specific or selective for the initially non-immobilized species (the antibody, in turn, can be directly labeled or indirectly labeled with, *e.g.*, a labeled anti-Ig antibody). Depending upon the order of addition of reaction components, test compounds that inhibit complex formation or that disrupt preformed complexes can be detected.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00249] Alternatively, the reaction can be conducted in a liquid phase in the presence or absence of the test compound, the reaction products separated from unreacted components, and complexes detected; *e.g.*, using an immobilized antibody specific or selective for one of the binding components to anchor any complexes formed in solution, and a labeled antibody specific or selective for the other partner to detect anchored complexes. Again, depending upon the order of addition of reactants to the liquid phase, test compounds that inhibit complex or that disrupt preformed complexes can be identified.

[00250] In an alternate embodiment of the invention, a homogeneous assay can be used. For example, a preformed complex of the target gene product and the interactive cellular or extracellular binding partner product is prepared in that either the target gene products or their binding partners are labeled, but the signal generated by the label is quenched due to complex formation (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,109,496 that utilizes this approach for immunoassays). The addition of a test substance that competes with and displaces one of the species from the preformed complex will result in the generation of a signal above background. In this way, test substances that disrupt target gene product-binding partner interaction can be identified.

[00251] In yet another aspect, the MID 4460 proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins, which bind to or interact with MID 4460 ("MID 4460-binding proteins" or "MID 4460-bp") and are involved in MID 4460 activity. Such MID 4460-bps can be activators or inhibitors of signals by the MID 4460 proteins or MID 4460 targets as, for example, downstream elements of a MID 4460-mediated signaling pathway.

[00252] 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 MID 4460 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. (Alternatively the: MID 4460 protein can be the fused to the activator domain.) If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a MID 4460-dependent complex, the DNA-binding and activation

WO 03/025199

PCT/US02/29353

domains of the transcription factor are brought into close 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 MID 4460 protein.

**[00253]** In another embodiment, modulators of MID 4460 expression are identified. For example, a cell or cell free mixture is contacted with a candidate compound and the expression of MID 4460 mRNA or protein evaluated relative to the level of expression of MID 4460 mRNA or protein in the absence of the candidate compound. When expression of MID 4460 mRNA or protein is greater in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of MID 4460 mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of MID 4460 mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of MID 4460 mRNA or protein expression. The level of MID 4460 mRNA or protein expression can be determined by methods described herein for detecting MID 4460 mRNA or protein.

**[00254]** 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 MID 4460 protein can be confirmed *in vivo*, *e.g.*, in an animal such as an animal model for aberrant or deficient phosphatase function or expression or for cardiovascular disease.

**[00255]** This invention further pertains to novel agents identified by the above-described screening assays. Accordingly, it is within the scope of this invention to further use an agent identified as described herein (*e.g.*, a MID 4460 modulating agent, an antisense MID 4460 nucleic acid molecule, a MID 4460-specific antibody, or a MID 4460-binding partner) in an appropriate animal model to determine the efficacy, toxicity, side effects, or mechanism of action, of treatment with such an agent. Furthermore, novel agents identified by the above-described screening assays can be used for treatments as described herein.

#### Detection Assays

**[00256]** Portions or fragments of the nucleic acid sequences identified herein can be used as polynucleotide reagents. For example, these sequences can be used to: (i) map their respective genes on a chromosome *e.g.*, to locate gene regions associated with genetic disease



WO 03/025199

PCT/US02/29353

or to associate MID 4460 with a disease; (ii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (iii) aid in forensic identification of a biological sample. These applications are described in the subsections below.

#### Chromosome Mapping

[00257] The MID 4460 nucleotide sequences or portions thereof can be used to map the location of the MID 4460 genes on a chromosome. This process is called chromosome mapping. Chromosome mapping is useful in correlating the MID 4460 sequences with genes associated with disease.

[00258] Briefly, MID 4460 genes can be mapped to chromosomes by preparing PCR primers (preferably 15-25 bp in length) from the MID 4460 nucleotide sequences. These primers can then be used for PCR screening of somatic cell hybrids containing individual human chromosomes. Only those hybrids containing the human gene corresponding to the MID 4460 sequences will yield an amplified fragment.

[00259] A panel of somatic cell hybrids in which each cell line contains either a single human chromosome or a small number of human chromosomes, and a full set of mouse chromosomes, can allow easy mapping of individual genes to specific human chromosomes. (D'Eustachio *et al.* (1983) *Science* 220:919-924).

[00260] Other mapping strategies *e.g.*, *in situ* hybridization (described in Fan *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6223-27), pre-screening with labeled flow-sorted chromosomes, and pre-selection by hybridization to chromosome specific cDNA libraries can be used to map MID 4460 to a chromosomal location.

[00261] Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of a DNA sequence to a metaphase chromosomal spread can further be used to provide a precise chromosomal location in one step. The FISH technique can be used with a DNA sequence as short as 500 or 600 bases. However, clones larger than 1,000 bases have a higher likelihood of binding to a unique chromosomal location with sufficient signal intensity for simple detection. Preferably 1,000 bases, and more preferably 2,000 bases will suffice to get good results at a reasonable amount of time. For a review of this technique, see Verma *et al.* (1988) *Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press, New York).

[00262] Reagents for chromosome mapping can be used individually to mark a single chromosome or a single site on that chromosome, or panels of reagents can be used for marking multiple sites and/or multiple chromosomes. Reagents corresponding to noncoding regions of the genes actually are preferred for mapping purposes. Coding sequences are more

WO 03/025199

PCT/US02/29353

likely to be conserved within gene families, thus increasing the chance of cross hybridizations during chromosomal mapping.

[00263] Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. (Such data are found, for example, in McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between a gene and a disease, mapped to the same chromosomal region, can then be identified through linkage analysis (co-inheritance of physically adjacent genes), described in, for example, Egeland *et al.* (1987) *Nature*, 325:783-787.

[00264] Moreover, differences in the DNA sequences between individuals affected and unaffected with a disease associated with the MID 4460 gene, can be determined. If a mutation is observed in some or all of the affected individuals but not in any unaffected individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the particular disease. Comparison of affected and unaffected individuals generally involves first looking for structural alterations in the chromosomes, such as deletions or translocations that are visible from chromosome spreads or detectable using PCR based on that DNA sequence. Ultimately, complete sequencing of genes from several individuals can be performed to confirm the presence of a mutation and to distinguish mutations from polymorphisms.

#### Tissue Typing

[00265] MID 4460 sequences can be used to identify individuals from biological samples using, *e.g.*, restriction fragment length polymorphism (RFLP). In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, the fragments separated, *e.g.*, in a Southern blot, and probed to yield bands for identification. The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP (described in U.S. Patent 5,272,057).

[00266] Furthermore, the sequences of the present invention can also be used to determine the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the MID 4460 nucleotide sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5' and 3' ends of the sequences. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it. Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00267] Allelic variation occurs to some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The noncoding sequences of SEQ ID NO:1 can provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers which each yield a noncoding amplified sequence of 100 bases. If predicted coding sequences, such as those in SEQ ID NO:3 are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

[00268] If a panel of reagents from MID 4460 nucleotide sequences described herein is used to generate a unique identification database for an individual, those same reagents can later be used to identify tissue from that individual. Using the unique identification database, positive identification of the individual, living or dead, can be made from extremely small tissue samples.

#### Use of Partial MID 4460 Sequences in Forensic Biology

[00269] DNA-based identification techniques can also be used in forensic biology. To make such an identification, PCR technology can be used to amplify DNA sequences taken from very small biological samples such as tissues, *e.g.*, hair or skin, or body fluids, *e.g.*, blood, saliva, or semen found at a crime scene. The amplified sequence can then be compared to a standard, thereby allowing identification of the origin of the biological sample.

[00270] The sequences of the present invention can be used to provide polynucleotide reagents, *e.g.*, PCR primers, targeted to specific loci in the human genome, which can enhance the reliability of DNA-based forensic identifications by, for example, providing another "identification marker" (i.e. another DNA sequence that is unique to a particular individual). As mentioned above, actual base sequence information can be used for identification as an accurate alternative to patterns formed by restriction enzyme generated fragments. Sequences targeted to noncoding regions of SEQ ID NO:1 (*e.g.*, fragments derived from the noncoding regions of SEQ ID NO:1 having a length of at least 20 bases, preferably at least 30 bases) are particularly appropriate for this use.

[00271] The MID 4460 nucleotide sequences described herein can further be used to provide polynucleotide reagents, *e.g.*, labeled or labelable probes which can be used in, for example, an *in situ* hybridization technique, to identify a specific tissue. This can be very useful in cases where a forensic pathologist is presented with a tissue of unknown origin.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Panels of such MID 4460 probes can be used to identify tissue by species and/or by organ type.

[00272] In a similar fashion, these reagents, *e.g.*, MID 4460 primers or probes can be used to screen tissue culture for contamination (*i.e.* screen for the presence of a mixture of different types of cells in a culture).

#### Predictive Medicine

[00273] 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.

[00274] Generally, the invention provides, a method of determining if a subject is at risk for a disorder related to a lesion in or the misexpression of a gene which encodes MID 4460.

[00275] Such disorders include, *e.g.*, a disorder associated with the misexpression of MID 4460 gene; a disorder of the hepatic or cardiovascular system.

[00276] The method includes one or more of the following:

[00277] detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation which affects the expression of the MID 4460 gene, or detecting the presence or absence of a mutation in a region which controls the expression of the gene, *e.g.*, a mutation in the 5' control region;

[00278] detecting, in a tissue of the subject, the presence or absence of a mutation which alters the structure of the MID 4460 gene;

[00279] detecting, in a tissue of the subject, the misexpression of the MID 4460 gene, at the mRNA level, *e.g.*, detecting a non-wild type level of an mRNA;

[00280] detecting, in a tissue of the subject, the misexpression of the gene, at the protein level, *e.g.*, detecting a non-wild type level of a MID 4460 polypeptide.

[00281] In preferred embodiments the method includes: ascertaining the existence of at least one of: a deletion of one or more nucleotides from the MID 4460 gene; an insertion of one or more nucleotides into the gene, a point mutation, *e.g.*, a substitution of one or more nucleotides of the gene, a gross chromosomal rearrangement of the gene, *e.g.*, a translocation, inversion, or deletion.

[00282] For example, detecting the genetic lesion can include: (i) providing a probe/primer including an oligonucleotide containing a region of nucleotide sequence which hybridizes to a sense or antisense sequence from SEQ ID NO:1, or naturally occurring mutants thereof or 5' or 3' flanking sequences naturally associated with the MID 4460 gene;

WO 03/025199

PCT/US02/29353

(ii) exposing the probe/primer to nucleic acid of the tissue; and detecting, by hybridization, *e.g.*, *in situ* hybridization, of the probe/primer to the nucleic acid, the presence or absence of the genetic lesion.

[00283] In preferred embodiments detecting the misexpression includes ascertaining the existence of at least one of: an alteration in the level of a messenger RNA transcript of the MID 4460 gene; the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of the gene; or a non-wild type level of MID 4460.

[00284] Methods of the invention can be used prenatally or to determine if a subject's offspring will be at risk for a disorder.

[00285] In preferred embodiments the method includes determining the structure of a MID 4460 gene, an abnormal structure being indicative of risk for the disorder.

[00286] In preferred embodiments the method includes contacting a sample from the subject with an antibody to the MID 4460 protein or a nucleic acid, which hybridizes specifically with the gene. These and other embodiments are discussed below.

#### Diagnostic and Prognostic Assays

[00287] The presence, level, or absence of MID 4460 protein or nucleic acid in a biological sample can be evaluated by obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting MID 4460 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) that encodes MID 4460 protein such that the presence of MID 4460 protein or nucleic acid is detected in the biological sample. The term "biological sample" includes tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. A preferred biological sample is serum. The level of expression of the MID 4460 gene can be measured in a number of ways, including, but not limited to: measuring the mRNA encoded by the MID 4460 genes; measuring the amount of protein encoded by the MID 4460 genes; or measuring the activity of the protein encoded by the MID 4460 genes.

[00288] The level of mRNA corresponding to the MID 4460 gene in a cell can be determined both by *in situ* and by *in vitro* formats.

[00289] The isolated mRNA can be used in hybridization or amplification assays that include, but are not limited to, Southern or Northern analyses, polymerase chain reaction analyses and probe arrays. One preferred diagnostic method for the detection of mRNA levels involves contacting the isolated mRNA with a nucleic acid molecule (probe) that can hybridize to the mRNA encoded by the gene being detected. The nucleic acid probe can be,

WO 03/025199

PCT/US02/29353

for example, a full-length MID 4460 nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 7, 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to MID 4460 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays are described herein.

**[00290]** In one format, mRNA (or cDNA) is immobilized on a surface and contacted with the probes, for example by running the isolated mRNA on an agarose gel and transferring the mRNA from the gel to a membrane, such as nitrocellulose. In an alternative format, the probes are immobilized on a surface and the mRNA (or cDNA) is contacted with the probes, for example, in a two-dimensional gene chip array. A skilled artisan can adapt known mRNA detection methods for use in detecting the level of mRNA encoded by the MID 4460 genes.

**[00291]** The level of mRNA in a sample that is encoded by one of MID 4460 can be evaluated with nucleic acid amplification, *e.g.*, by rtPCR (Mullis (1987) U.S. Patent No. 4,683,202), ligase chain reaction (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), self sustained sequence replication (Guatelli *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh *et al.*, (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.*, (1988) *Bio/Technology* 6:1197), rolling circle replication (Lizardi *et al.*, U.S. Patent No. 5,854,033) or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques known in the art. As used herein, amplification primers are defined as being a pair of nucleic acid molecules that can anneal to 5' or 3' regions of a gene (plus and minus strands, respectively, or vice-versa) and contain a short region in between. In general, amplification primers are from about 10 to 30 nucleotides in length and flank a region from about 50 to 200 nucleotides in length. Under appropriate conditions and with appropriate reagents, such primers permit the amplification of a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence flanked by the primers.

**[00292]** For *in situ* methods, a cell or tissue sample can be prepared/processed and immobilized on a support, typically a glass slide, and then contacted with a probe that can hybridize to mRNA that encodes the MID 4460 gene being analyzed.

**[00293]** In another embodiment, the methods further contacting a control sample with a compound or agent capable of detecting MID 4460 mRNA, or genomic DNA, and comparing the presence of MID 4460 mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of MID 4460 mRNA or genomic DNA in the test sample.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00294] A variety of methods can be used to determine the level of protein encoded by MID 4460. In general, these methods include contacting an agent that selectively binds to the protein, such as an antibody with a sample, to evaluate the level of protein in the sample. In a preferred embodiment, the antibody bears a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (*e.g.*, Fab or F(ab')<sub>2</sub>) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (*i.e.*, physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with a detectable substance. Examples of detectable substances are provided herein.

[00295] The detection methods can be used to detect MID 4460 protein in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. *In vitro* techniques for detection of MID 4460 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), immunoprecipitations, immunofluorescence, enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), and Western blot analysis. *In vivo* techniques for detection of MID 4460 protein include introducing into a subject a labeled anti-MID 4460 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.

[00296] In another embodiment, the methods further include contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting MID 4460 protein, and comparing the presence of MID 4460 protein in the control sample with the presence of MID 4460 protein in the test sample.

[00297] The invention also includes kits for detecting the presence of MID 4460 in a biological sample. For example, the kit can include a compound or agent capable of detecting MID 4460 protein or mRNA in a biological sample; and a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect MID 4460 protein or nucleic acid.

[00298] For antibody-based kits, the kit can include: (1) a first antibody (*e.g.*, attached to a solid support) which binds to a polypeptide corresponding to a marker of the invention; and, optionally, (2) a second, different antibody which binds to either the polypeptide or the first antibody and is conjugated to a detectable agent.

[00299] For oligonucleotide-based kits, the kit can include: (1) an oligonucleotide, *e.g.*, a detectably labeled oligonucleotide, which hybridizes to a nucleic acid sequence encoding a

WO 03/025199

PCT/US02/29353

polypeptide corresponding to a marker of the invention or (2) a pair of primers useful for amplifying a nucleic acid molecule corresponding to a marker of the invention. The kit can also include a buffering agent, a preservative, or a protein stabilizing agent. The kit can also include components necessary for detecting the detectable agent (*e.g.*, an enzyme or a substrate). The kit can also contain a control sample or a series of control samples which can be assayed and compared to the test sample contained. Each component of the kit can be enclosed within an individual container and all of the various containers can be within a single package, along with instructions for interpreting the results of the assays performed using the kit.

**[00300]** The diagnostic methods described herein can identify subjects having, or at risk of developing, a disease or disorder associated with misexpressed or aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity. As used herein, the term "unwanted" includes an unwanted phenomenon involved in a biological response such as pain or deregulated cell proliferation.

**[00301]** In one embodiment, a disease or disorder associated with aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity is identified. A test sample is obtained from a subject and MID 4460 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) is evaluated, wherein the level, *e.g.*, the presence or absence, of MID 4460 protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity. As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest, including a biological fluid (*e.g.*, serum), cell sample, or tissue.

**[00302]** The prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for a cardiovascular disorder such as atherosclerosis, hypercholesterolemia, angina, coronary artery disease, stroke, *etc.*

**[00303]** The methods of the invention can also be used to detect genetic alterations in a MID 4460 gene, thereby determining if a subject with the altered gene is at risk for a disorder characterized by misregulation in MID 4460 protein activity or nucleic acid expression, such as a cardiovascular disorder. In preferred embodiments, the methods include detecting, in a sample from the subject, the presence or absence of a genetic alteration characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a MID 4460-protein, or



WO 03/025199

PCT/US02/29353

the mis-expression of the MID 4460 gene. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a MID 4460 gene; 2) an addition of one or more nucleotides to a MID 4460 gene; 3) a substitution of one or more nucleotides of a MID 4460 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a MID 4460 gene; 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a MID 4460 gene, 6) aberrant modification of a MID 4460 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 MID 4460 gene, 8) a non-wild type level of a MID 4460-protein, 9) allelic loss of a MID 4460 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a MID 4460-protein.

**[00304]** An alteration can be detected without a probe/primer in a polymerase chain reaction, such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the MID 4460-gene. This method can include the steps of collecting a sample of cells from a subject, isolating nucleic acid (*e.g.*, genomic, mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a MID 4460 gene under conditions such that hybridization and amplification of the MID 4460 gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein. Alternatively, other amplification methods described herein or known in the art can be used.

**[00305]** In another embodiment, mutations in a MID 4460 gene from a sample cell can be identified by detecting alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined, *e.g.*, by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

**[00306]** In other embodiments, genetic mutations in MID 4460 can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or RNA, two dimensional arrays, *e.g.*, chip based arrays. Such arrays include a plurality of addresses, each of which is positionally distinguishable from the other. A different probe is located at each address of the

WO 03/025199

PCT/US02/29353

plurality. The arrays can have a high density of addresses, *e.g.*, can contain hundreds or thousands of oligonucleotide probes (Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). For example, genetic mutations in MID 4460 can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin, M.T. *et al. supra*. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

[00307] In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the MID 4460 gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample MID 4460 with the corresponding wild-type (control) sequence. Automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve *et al.* (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry.

[00308] Other methods for detecting mutations in the MID 4460 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242; Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295).

[00309] 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 MID 4460 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662; U.S. Patent No. 5,459,039).

[00310] In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in MID 4460 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) can be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA*: 86:2766, see also Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144; and Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control MID 4460 nucleic

WO 03/025199

PCT/US02/29353

acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments can be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay can be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5).

[00311] In yet another embodiment, the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 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* 265:12753).

[00312] Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163); Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 86:6230).

[00313] Alternatively, allele specific amplification technology which depends on selective PCR amplification can be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as primers for specific amplification can carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection (Gasparini *et al.* (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). It is anticipated that in certain embodiments amplification can also be performed using Taq ligase for amplification (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:189-93). In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00314] The methods described herein can be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which can be conveniently used, *e.g.*, in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a MID 4460 gene.

Use of MID 4460 Molecules as Surrogate Markers

[00315] The MID 4460 molecules of the invention are also useful as markers of disorders or disease states, as markers for precursors of disease states, as markers for predisposition of disease states, as markers of drug activity, or as markers of the pharmacogenomic profile of a subject. Using the methods described herein, the presence, absence and/or quantity of the MID 4460 molecules of the invention can be detected, and can be correlated with one or more biological states *in vivo*. For example, the MID 4460 molecules of the invention can serve as surrogate markers for one or more disorders or disease states or for conditions leading up to disease states. As used herein, a "surrogate marker" is an objective biochemical marker which correlates with the absence or presence of a disease or disorder, or with the progression of a disease or disorder (*e.g.*, with the presence or absence of a tumor). The presence or quantity of such markers is independent of the disease. Therefore, these markers can serve to indicate whether a particular course of treatment is effective in lessening a disease state or disorder. Surrogate markers are of particular use when the presence or extent of a disease state or disorder is difficult to assess through standard methodologies (*e.g.*, early stage tumors), or when an assessment of disease progression is desired before a potentially dangerous clinical endpoint is reached (*e.g.*, an assessment of cardiovascular disease can be made using cholesterol levels as a surrogate marker, and an analysis of HIV infection can be made using HIV RNA levels as a surrogate marker, well in advance of the undesirable clinical outcomes of myocardial infarction or fully-developed AIDS). Examples of the use of surrogate markers in the art include: Koomen *et al.* (2000) *J. Mass. Spectrom.* 35: 258-264; and James (1994) *AIDS Treatment News Archive* 209.

[00316] The MID 4460 molecules of the invention are also useful as pharmacodynamic markers. As used herein, a "pharmacodynamic marker" is an objective biochemical marker which correlates specifically with drug effects. The presence or quantity of a pharmacodynamic marker is not related to the disease state or disorder for which the drug is being administered; therefore, the presence or quantity of the marker is indicative of the presence or activity of the drug in a subject. For example, a pharmacodynamic marker can be

WO 03/025199

PCT/US02/29353

indicative of the concentration of the drug in a biological tissue, in that the marker is either expressed or transcribed or not expressed or transcribed in that tissue in relationship to the level of the drug. In this fashion, the distribution or uptake of the drug can be monitored by the pharmacodynamic marker. Similarly, the presence or quantity of the pharmacodynamic marker can be related to the presence or quantity of the metabolic product of a drug, such that the presence or quantity of the marker is indicative of the relative breakdown rate of the drug *in vivo*. Pharmacodynamic markers are of particular use in increasing the sensitivity of detection of drug effects, particularly when the drug is administered in low doses. Since even a small amount of a drug can be sufficient to activate multiple rounds of marker (*e.g.*, a MID 4460 marker) transcription or expression, the amplified marker can be in a quantity which is more readily detectable than the drug itself. Also, the marker can be more easily detected due to the nature of the marker itself; for example, using the methods described herein, anti-MID 4460 antibodies can be employed in an immune-based detection system for a MID 4460 protein marker, or MID 4460-specific radiolabeled probes can be used to detect a MID 4460 mRNA marker. Furthermore, the use of a pharmacodynamic marker can offer mechanism-based prediction of risk due to drug treatment beyond the range of possible direct observations. Examples of the use of pharmacodynamic markers in the art include: Matsuda *et al.* US 6,033,862; Hattis *et al.* (1991) *Env. Health Perspect.* 90: 229-238; Schentag (1999) *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S21-S24; and Nicolau (1999) *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 56 Suppl. 3: S16-S20.

[00317] The MID 4460 molecules of the invention are also useful as pharmacogenomic markers. As used herein, a "pharmacogenomic marker" is an objective biochemical marker which correlates with a specific clinical drug response or susceptibility in a subject (see, *e.g.*, McLeod *et al.* (1999) *Eur. J. Cancer* 35:1650-1652). The presence or quantity of the pharmacogenomic marker is related to the predicted response of the subject to a specific drug or class of drugs prior to administration of the drug. By assessing the presence or quantity of one or more pharmacogenomic markers in a subject, a drug therapy which is most appropriate for the subject, or which is predicted to have a greater degree of success, can be selected. For example, based on the presence or quantity of RNA, or protein (*e.g.*, MID 4460 protein or RNA) for specific tumor markers in a subject, a drug or course of treatment can be selected that is optimized for the treatment of the specific tumor likely to be present in the subject. Similarly, the presence or absence of a specific sequence mutation in MID 4460 DNA can correlate with a MID 4460 drug response. The use of pharmacogenomic markers

WO 03/025199

PCT/US02/29353

therefore permits the application of the most appropriate treatment for each subject without having to administer the therapy.

#### Pharmaceutical Compositions

**[00318]** The nucleic acid and polypeptides, fragments thereof, as well as anti-MID 4460 antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions. Such compositions typically include the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" includes solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

**[00319]** A pharmaceutical composition is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

**[00320]** Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringability exists. It should be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example,

WO 03/025199

PCT/US02/29353

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

**[00321]** Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle 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 sterile-filtered solution thereof.

**[00322]** Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. 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, *e.g.*, gelatin capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash.

Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

**[00323]** 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.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00324] Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For 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 formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

[00325] The compounds can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

[00326] In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells 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.

[00327] It is advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

[00328] Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the 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 the therapeutic index and it can be expressed as the ratio LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Compounds which exhibit high therapeutic indices are preferred. While compounds that exhibit toxic side effects can be used, care should be taken to design a delivery system that



WO 03/025199

PCT/US02/29353

targets such compounds to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby, reduce side effects.

[00329] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC<sub>50</sub> (i.e., the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

[00330] As defined herein, a therapeutically effective amount of protein or polypeptide (i.e., an effective dosage) ranges from about 0.001 to 30 mg/kg body weight, preferably about 0.01 to 25 mg/kg body weight, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg body weight, and even more preferably about 1 to 10 mg/kg, 2 to 9 mg/kg, 3 to 8 mg/kg, 4 to 7 mg/kg, or 5 to 6 mg/kg body weight. The protein or polypeptide can be administered one time per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. The skilled artisan will appreciate that certain factors can influence the dosage and timing required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody, unconjugated or conjugated as described herein, can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.

[00331] For antibodies, the preferred dosage is 0.1 mg/kg of body weight (generally 10 mg/kg to 20 mg/kg). If the antibody is to act in the brain, a dosage of 50 mg/kg to 100 mg/kg is usually appropriate. Generally, partially human antibodies and fully human antibodies have a longer half-life within the human body than other antibodies. Accordingly, lower dosages and less frequent administration is often possible. Modifications such as lipidation can be used to stabilize antibodies and to enhance uptake and tissue penetration (*e.g.*, into the brain). A method for lipidation of antibodies is described by Cruikshank *et al.* ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14:193).

WO 03/025199

PCT/US02/29353

**[00332]** The present invention encompasses agents which modulate expression or activity. An agent can, for example, be a small molecule. For example, such small molecules include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics (*e.g.*, peptoids), amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) having a molecular weight less than about 10,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 5,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 1,000 grams per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds.

**[00333]** Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per kilogram of subject or sample weight (*e.g.*, about 1 microgram per kilogram to about 500 milligrams per kilogram, about 100 micrograms per kilogram to about 5 milligrams per kilogram, or about 1 microgram per kilogram to about 50 micrograms per kilogram. It is furthermore understood that appropriate doses of a small molecule depend upon the potency of the small molecule with respect to the expression or activity to be modulated. When one or more of these small molecules is to be administered to an animal (*e.g.*, a human) in order to modulate expression or activity of a polypeptide or nucleic acid of the invention, a physician, veterinarian, or researcher can, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is understood that the specific dose level for any particular animal subject will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health, gender, and diet of the subject, the time of administration, the route of administration, the rate of excretion, any drug combination, and the degree of expression or activity to be modulated.

**[00334]** The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent 5,328,470) or by stereotactic injection (see *e.g.*, Chen *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). 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 delivery system.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00335] The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Methods of Treatment:

[00336] The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity. As used herein, the term "treatment" is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of disease or a predisposition toward a disease, with the purpose to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease, the symptoms of disease or the predisposition toward disease. A therapeutic agent includes, but is not limited to, small molecules, peptides, antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.

[00337] With regards to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments can be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. "Pharmacogenomics", as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, the term refers the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (e.g., a patient's "drug response phenotype", or "drug response genotype".) Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring an individual's prophylactic or therapeutic treatment with either the MID 4460 molecules of the present invention or MID 4460 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.

[00338] In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a disease or condition associated with an aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity, by administering to the subject a MID 4460 or an agent which modulates MID 4460 expression or at least one MID 4460 activity. Subjects at risk for a disease which is caused or contributed to by aberrant or unwanted MID 4460 expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms

WO 03/025199

PCT/US02/29353

characteristic of the MID 4460 aberrance, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of MID 4460 aberrance, for example, a MID 4460, MID 4460 agonist or MID 4460 antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

[00339] It is possible that some MID 4460 disorders can be caused, at least in part, by an abnormal level of gene product, or by the presence of a gene product exhibiting abnormal activity. As such, the reduction in the level and/or activity of such gene products would bring about the amelioration of disorder symptoms.

[00340] The MID 4460 molecules can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more of cardiovascular disorders, and liver disorders, all of which are described above. The molecules of the invention also can act as novel diagnostic targets and therapeutic agents for controlling one or more of cellular proliferative and/or differentiative disorders, disorders associated with bone metabolism, immune, *e.g.*, inflammatory, disorders, endothelial cell disorders, viral diseases, pain disorders and metabolic disorders.

[00341] Examples of cellular proliferative and/or differentiative disorders include cancer, *e.g.*, carcinoma, sarcoma, metastatic disorders or hematopoietic neoplastic disorders, *e.g.*, leukemias. A metastatic tumor can arise from a multitude of primary tumor types, including but not limited to those of prostate, colon, lung, breast and liver origin.

[00342] As used herein, the term "cancer" (also used interchangeably with the terms, "hyperproliferative" and "neoplastic") refers to cells having the capacity for autonomous growth, *i.e.*, an abnormal state or condition characterized by rapidly proliferating cell growth. Cancerous disease states may be categorized as pathologic, *i.e.*, characterizing or constituting a disease state, *e.g.*, malignant tumor growth, or may be categorized as non-pathologic, *i.e.*, a deviation from normal but not associated with a disease state, *e.g.*, cell proliferation associated with wound repair. The term is meant to include all types of cancerous growths or oncogenic processes, metastatic tissues or malignantly transformed cells, tissues, or organs, irrespective of histopathologic type or stage of invasiveness. The term "cancer" includes malignancies of the various organ systems, such as those affecting lung, breast, thyroid, lymphoid, gastrointestinal, and genito-urinary tract, as well as adenocarcinomas which include malignancies such as most colon cancers, renal-cell carcinoma, prostate cancer and/or testicular tumors, non-small cell carcinoma of the lung, cancer of the small intestine and cancer of the esophagus. The term "carcinoma" is art recognized and refers to malignancies

WO 03/025199

PCT/US02/29353

of epithelial or endocrine tissues including respiratory system carcinomas, gastrointestinal system carcinomas, genitourinary system carcinomas, testicular carcinomas, breast carcinomas, prostatic carcinomas, endocrine system carcinomas, and melanomas. Exemplary carcinomas include those forming from tissue of the cervix, lung, prostate, breast, head and neck, colon and ovary. The term "carcinoma" also includes carcinosarcomas, *e.g.*, which include malignant tumors composed of carcinomatous and sarcomatous tissues. An "adenocarcinoma" refers to a carcinoma derived from glandular tissue or in which the tumor cells form recognizable glandular structures. The term "sarcoma" is art recognized and refers to malignant tumors of mesenchymal derivation.

**[00343]** The MID 4460 molecules of the invention can be used to monitor, treat and/or diagnose a variety of proliferative disorders. Such disorders include hematopoietic neoplastic disorders. As used herein, the term "hematopoietic neoplastic disorders" includes diseases involving hyperplastic/neoplastic cells of hematopoietic origin, *e.g.*, arising from myeloid, lymphoid or erythroid lineages, or precursor cells thereof. Preferably, the diseases arise from poorly differentiated acute leukemias, *e.g.*, erythroblastic leukemia and acute megakaryoblastic leukemia. Additional exemplary myeloid disorders include, but are not limited to, acute promyeloid leukemia (APML), acute myelogenous leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML) (reviewed in Vaickus (1991) *Crit Rev. in Oncol./Hematol.* 11:267-97); lymphoid malignancies include, but are not limited to acute lymphoblastic leukemia (ALL) which includes B-lineage ALL and T-lineage ALL, chronic lymphocytic leukemia (CLL), prolymphocytic leukemia (PLL), hairy cell leukemia (HLL) and Waldenstrom's macroglobulinemia (WM). Additional forms of malignant lymphomas include, but are not limited to non-Hodgkin lymphoma and variants thereof, peripheral T cell lymphomas, adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), cutaneous T-cell lymphoma (CTCL), large granular lymphocytic leukemia (LGL), Hodgkin's disease and Reed-Sternberg disease.

**[00344]** Aberrant expression and/or activity of MID 4460 molecules can mediate disorders associated with bone metabolism. "Bone metabolism" refers to direct or indirect effects in the formation or degeneration of bone structures, *e.g.*, bone formation, bone resorption, etc., which can ultimately affect the concentrations in serum of calcium and phosphate. This term also includes activities mediated by MID 4460 molecules in bone cells, *e.g.* osteoclasts and osteoblasts, that can in turn result in bone formation and degeneration. For example, MID 4460 molecules can support different activities of bone resorbing osteoclasts such as the stimulation of differentiation of monocytes and mononuclear phagocytes into osteoclasts. Accordingly, MID 4460 molecules that modulate the production of bone cells can influence

WO 03/025199

PCT/US02/29353

bone formation and degeneration, and thus can be used to treat bone disorders. Examples of such disorders include, but are not limited to, osteoporosis, osteodystrophy, osteomalacia, rickets, osteitis fibrosa cystica, renal osteodystrophy, osteosclerosis, anti-convulsant treatment, osteopenia, fibrogenesis-imperfecta ossium, secondary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism, hyperparathyroidism, cirrhosis, obstructive jaundice, drug induced metabolism, medullary carcinoma, chronic renal disease, rickets, sarcoidosis, glucocorticoid antagonism, malabsorption syndrome, steatorrhea, tropical sprue, idiopathic hypercalcemia and milk fever.

**[00345]** The MID 4460 nucleic acid and protein of the invention can be used to treat and/or diagnose a variety of immune, *e.g.*, inflammatory (*e.g.* respiratory inflammatory) disorders. Examples immune and inflammatory disorders or diseases include, but are not limited to, autoimmune diseases (including, for example, diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, inflammatory bowel disease, *e.g.* Crohn's disease and ulcerative colitis, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, asthma, allergic asthma, chronic obstructive pulmonary disease, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis, acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polychondritis, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, and interstitial lung fibrosis), graft-versus-host disease, cases of transplantation, and allergy such as, atopic allergy.

**[00346]** As used herein, disorders involving the heart, or "cardiovascular disease" or a "cardiovascular disorder" includes a disease or disorder which affects the cardiovascular system, *e.g.*, the heart, the blood vessels, and/or the blood. A cardiovascular disorder can be caused by an imbalance in arterial pressure, a malfunction of the heart, or an occlusion of a blood vessel, *e.g.*, by a thrombus, embolus, or plaque. A cardiovascular disorder includes, but is not limited to disorders such as arteriosclerosis, atherosclerosis, cardiac hypertrophy, ischemia reperfusion injury, restenosis, arterial inflammation, vascular wall remodeling, ventricular remodeling, rapid ventricular pacing, coronary microembolism, tachycardia,

WO 03/025199

PCT/US02/29353

bradycardia, pressure overload, aortic bending, coronary artery ligation, vascular heart disease, coronary artery disease, valvular disease, including but not limited to, valvular degeneration caused by calcification, rheumatic heart disease, endocarditis, or complications of artificial valves; atrial fibrillation, long-QT syndrome, congestive heart failure, sinus node dysfunction, angina, heart failure, hypertension, atrial fibrillation, atrial flutter, pericardial disease, including but not limited to, pericardial effusion and pericarditis; cardiomyopathies, *e.g.*, dilated cardiomyopathy or idiopathic cardiomyopathy, myocardial infarction, coronary artery disease, coronary artery spasm, ischemic disease, arrhythmia, sudden cardiac death, and cardiovascular developmental disorders (*e.g.*, arteriovenous malformations, arteriovenous fistulae, raynaud's syndrome, neurogenic thoracic outlet syndrome, causalgia/reflex sympathetic dystrophy, hemangioma, aneurysm, cavernous angioma, aortic valve stenosis, atrial septal defects, atrioventricular canal, coarctation of the aorta, ebsteins anomaly, hypoplastic left heart syndrome, interruption of the aortic arch, mitral valve prolapse, ductus arteriosus, patent foramen ovale, partial anomalous pulmonary venous return, pulmonary atresia with ventricular septal defect, pulmonary atresia without ventricular septal defect, persistence of the fetal circulation, pulmonary valve stenosis, single ventricle, total anomalous pulmonary venous return, transposition of the great vessels, tricuspid atresia, truncus arteriosus, ventricular septal defects). A cardiovascular disease or disorder also can include an endothelial cell disorder.

**[00347]** As used herein, an "endothelial cell disorder" includes a disorder characterized by aberrant, unregulated, or unwanted endothelial cell activity, *e.g.*, proliferation, migration, angiogenesis, or vascularization; or aberrant expression of cell surface adhesion molecules or genes associated with angiogenesis, *e.g.*, TIE-2, FLT and FLK. Endothelial cell disorders include tumorigenesis, tumor metastasis, psoriasis, diabetic retinopathy, endometriosis, Grave's disease, ischemic disease (*e.g.*, atherosclerosis), and chronic inflammatory diseases (*e.g.*, rheumatoid arthritis).

**[00348]** Disorders which can be treated or diagnosed by methods described herein include, but are not limited to, disorders associated with an accumulation in the liver of fibrous tissue, such as that resulting from an imbalance between production and degradation of the extracellular matrix accompanied by the collapse and condensation of preexisting fibers. The methods described herein can be used to diagnose or treat hepatocellular necrosis or injury induced by a wide variety of agents including processes which disturb homeostasis, such as an inflammatory process, tissue damage resulting from toxic injury or altered hepatic blood flow, and infections (*e.g.*, bacterial, viral and parasitic). For example, the methods can be

WO 03/025199

PCT/US02/29353

used for the early detection of hepatic injury, such as portal hypertension or hepatic fibrosis. In addition, the methods can be employed to detect liver fibrosis attributed to inborn errors of metabolism, for example, fibrosis resulting from a storage disorder such as Gaucher's disease (lipid abnormalities) or a glycogen storage disease, A1-antitrypsin deficiency; a disorder mediating the accumulation (*e.g.*, storage) of an exogenous substance, for example, hemochromatosis (iron-overload syndrome) and copper storage diseases (Wilson's disease), disorders resulting in the accumulation of a toxic metabolite (*e.g.*, tyrosinemia, fructosemia and galactosemia) and peroxisomal disorders (*e.g.*, Zellweger syndrome). Additionally, the methods described herein can be useful for the early detection and treatment of liver injury associated with the administration of various chemicals or drugs, such as for example, methotrexate, isoniazid, oxyphenisatin, methyl dopa, chlorpromazine, tolbutamide or alcohol, or which represents a hepatic manifestation of a vascular disorder such as obstruction of either the intrahepatic or extrahepatic bile flow or an alteration in hepatic circulation resulting, for example, from chronic heart failure, veno-occlusive disease, portal vein thrombosis or Budd-Chiari syndrome.

[00349] Additionally, MID 4460 molecules can play an important role in the etiology of certain viral diseases, including but not limited to Hepatitis B, Hepatitis C and Herpes Simplex Virus (HSV). Modulators of MID 4460 activity could be used to control viral diseases. The modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of viral infected tissue or virus-associated tissue fibrosis, especially liver and liver fibrosis. Also, MID 4460 modulators can be used in the treatment and/or diagnosis of virus-associated carcinoma, especially hepatocellular cancer.

[00350] Additionally, MID 4460 can play an important role in the regulation of metabolism or pain disorders. Diseases of metabolic imbalance include, but are not limited to, obesity, anorexia nervosa, cachexia, lipid disorders, and diabetes. Examples of pain disorders include, but are not limited to, pain response elicited during various forms of tissue injury, *e.g.*, inflammation, infection, and ischemia, usually referred to as hyperalgesia (described in, for example, Fields, H.L. (1987) *Pain*, New York:McGraw-Hill); pain associated with musculoskeletal disorders, *e.g.*, joint pain; tooth pain; headaches; pain associated with surgery; pain related to irritable bowel syndrome; or chest pain.

[00351] As discussed, successful treatment of MID 4460 disorders can be brought about by techniques that serve to inhibit the expression or activity of target gene products. For example, compounds, *e.g.*, an agent identified using an assays described above, that proves to



WO 03/025199

PCT/US02/29353

exhibit negative modulatory activity, can be used in accordance with the invention to prevent and/or ameliorate symptoms of MID 4460 disorders. Such molecules can include, but are not limited to peptides, phosphopeptides, small organic or inorganic molecules, or antibodies (including, for example, polyclonal, monoclonal, humanized, human, anti-idiotypic, chimeric or single chain antibodies, and Fab, F(ab')<sub>2</sub> and Fab expression library fragments, scFV molecules, and epitope-binding fragments thereof).

**[00352]** Further, antisense and ribozyme molecules that inhibit expression of the target gene can also be used in accordance with the invention to reduce the level of target gene expression, thus effectively reducing the level of target gene activity. Still further, triple helix molecules can be utilized in reducing the level of target gene activity. Antisense, ribozyme and triple helix molecules are discussed above.

**[00353]** It is possible that the use of antisense, ribozyme, and/or triple helix molecules to reduce or inhibit mutant gene expression can also reduce or inhibit the transcription (triple helix) and/or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal target gene alleles, such that the concentration of normal target gene product present can be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, nucleic acid molecules that encode and express target gene polypeptides exhibiting normal target gene activity can be introduced into cells via gene therapy method. Alternatively, in instances in that the target gene encodes an extracellular protein, it can be preferable to co-administer normal target gene protein into the cell or tissue in order to maintain the requisite level of cellular or tissue target gene activity.

**[00354]** Another method by which nucleic acid molecules can be utilized in treating or preventing a disease characterized by MID 4460 expression is through the use of aptamer molecules specific for MID 4460 protein. Aptamers are nucleic acid molecules having a tertiary structure which permits them to specifically or selectively bind to protein ligands (see, e.g., Osborne *et al.* (1997) *Curr. Opin. Chem Biol.* 1: 5-9; and Patel (1997) *Curr Opin Chem Biol* 1:32-46). Since nucleic acid molecules can in many cases be more conveniently introduced into target cells than therapeutic protein molecules can be, aptamers offer a method by which MID 4460 protein activity can be specifically decreased without the introduction of drugs or other molecules which can have pluripotent effects.

**[00355]** Antibodies can be generated that are both specific for target gene product and that reduce target gene product activity. Such antibodies can, therefore, by administered in instances whereby negative modulatory techniques are appropriate for the treatment of MID 4460 disorders. For a description of antibodies, see the Antibody section above.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

[00356] In circumstances wherein injection of an animal or a human subject with a MID 4460 protein or epitope for stimulating antibody production is harmful to the subject, it is possible to generate an immune response against MID 4460 through the use of anti-idiotypic antibodies (see, for example, Herlyn (1999) *Ann Med* 31:66-78; and Bhattacharya-Chatterjee and Foon (1998) *Cancer Treat Res.* 94:51-68). If an anti-idiotypic antibody is introduced into a mammal or human subject, it should stimulate the production of anti-anti-idiotypic antibodies, which should be specific to the MID 4460 protein. Vaccines directed to a disease characterized by MID 4460 expression can also be generated in this fashion.

[00357] In instances where the target antigen is intracellular and whole antibodies are used, internalizing antibodies can be preferred. Lipofectin or liposomes can be used to deliver the antibody or a fragment of the Fab region that binds to the target antigen into cells. Where fragments of the antibody are used, the smallest inhibitory fragment that binds to the target antigen is preferred. For example, peptides having an amino acid sequence corresponding to the Fv region of the antibody can be used. Alternatively, single chain neutralizing antibodies that bind to intracellular target antigens can also be administered. Such single chain antibodies can be administered, for example, by expressing nucleotide sequences encoding single-chain antibodies within the target cell population (see *e.g.*, Marasco *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893).

[00358] The identified compounds that inhibit target gene expression, synthesis and/or activity can be administered to a patient at therapeutically effective doses to prevent, treat or ameliorate MID 4460 disorders. A therapeutically effective dose refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms of the disorders. Toxicity and therapeutic efficacy of such compounds can be determined by standard pharmaceutical procedures as described above.

[00359] The data obtained from the cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage can vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized. For any compound used in the method of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose can be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC<sub>50</sub> (i.e., the concentration of the test compound that achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in cell culture. Such

WO 03/025199

PCT/US02/29353

information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma can be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

[00360] Another example of determination of effective dose for an individual is the ability to directly assay levels of "free" and "bound" compound in the serum of the test subject. Such assays can utilize antibody mimics and/or "biosensors" that have been created through molecular imprinting techniques. The compound which is able to modulate MID 4460 activity is used as a template, or "imprinting molecule", to spatially organize polymerizable monomers prior to their polymerization with catalytic reagents. The subsequent removal of the imprinted molecule leaves a polymer matrix which contains a repeated "negative image" of the compound and is able to selectively rebind the molecule under biological assay conditions. A detailed review of this technique can be seen in Ansell *et al* (1996) *Current Opinion in Biotechnology* 7:89-94 and in Shea (1994) *Trends in Polymer Science* 2:166-173. Such "imprinted" affinity matrixes are amenable to ligand-binding assays, whereby the immobilized monoclonal antibody component is replaced by an appropriately imprinted matrix. An example of the use of such matrixes in this way can be seen in Vlatakis *et al* (1993) *Nature* 361:645-647. Through the use of isotope-labeling, the "free" concentration of compound which modulates the expression or activity of MID 4460 can be readily monitored and used in calculations of  $IC_{50}$ .

[00361] Such "imprinted" affinity matrixes can also be designed to include fluorescent groups whose photon-emitting properties measurably change upon local and selective binding of target compound. These changes can be readily assayed in real time using appropriate fiberoptic devices, in turn allowing the dose in a test subject to be quickly optimized based on its individual  $IC_{50}$ . A rudimentary example of such a "biosensor" is discussed in Kriz *et al* (1995) *Analytical Chemistry* 67:2142-2144.

[00362] Another aspect of the invention pertains to methods of modulating MID 4460 expression or activity for therapeutic purposes. Accordingly, in an exemplary embodiment, the modulatory method of the invention involves contacting a cell with a MID 4460 or agent that modulates one or more of the activities of MID 4460 protein activity associated with the cell. An agent that modulates MID 4460 protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring target molecule of a MID 4460 protein (*e.g.*, a MID 4460 substrate or receptor), a MID 4460 antibody, a MID 4460 agonist or antagonist, a peptidomimetic of a MID 4460 agonist or antagonist, or other small molecule.

WO 03/025199

PCT/US02/29353

**[00363]** In one embodiment, the agent stimulates one or MID 4460 activities. Examples of such stimulatory agents include active MID 4460 protein and a nucleic acid molecule encoding MID 4460. In another embodiment, the agent inhibits one or more MID 4460 activities. Examples of such inhibitory agents include antisense MID 4460 nucleic acid molecules, anti-MID 4460 antibodies, and MID 4460 inhibitors. These modulatory methods can be performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant or unwanted expression or activity of a MID 4460 protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., up regulates or down regulates) MID 4460 expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a MID 4460 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted MID 4460 expression or activity.

**[00364]** Stimulation of MID 4460 activity is desirable in situations in which MID 4460 is abnormally downregulated and/or in which increased MID 4460 activity is likely to have a beneficial effect. For example, stimulation of MID 4460 activity is desirable in situations in which a MID 4460 is downregulated and/or in which increased MID 4460 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of MID 4460 activity is desirable in situations in which MID 4460 is abnormally upregulated and/or in which decreased MID 4460 activity is likely to have a beneficial effect.

#### Pharmacogenomics

**[00365]** The MID 4460 molecules of the present invention, as well as agents, or modulators which have a stimulatory or inhibitory effect on MID 4460 activity (e.g., MID 4460 gene expression) as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) MID 4460-associated disorders (e.g., aberrant or deficient phosphatase function or expression or cardiovascular disorder) associated with aberrant or unwanted MID 4460 activity. In conjunction with such treatment, pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) can be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician can consider applying knowledge obtained in relevant

WO 03/025199

PCT/US02/29353

pharmacogenomics studies in determining whether to administer a MID 4460 molecule or MID 4460 modulator as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with a MID 4460 molecule or MID 4460 modulator.

**[00366]** Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See, for example, Eichelbaum *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23:983-985 and Linder *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43:254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

**[00367]** One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (*e.g.*, a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants.) Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase *II/III* drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high resolution map can be generated from a combination of some ten-million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP can occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP can be involved in a disease process, however, the vast majority can not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that can be common among such genetically similar individuals.

**[00368]** 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

WO 03/025199

PCT/US02/29353

drug's target is known (*e.g.*, a MID 4460 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.

[00369] Alternatively, a method termed the "gene expression profiling", can be utilized to identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (*e.g.*, a MID 4460 molecule or MID 4460 modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

[00370] Information generated from more than one of the above pharmacogenomics approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of an individual. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a MID 4460 molecule or MID 4460 modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

[00371] The present invention further provides methods for identifying new agents, or combinations, that are based on identifying agents that modulate the activity of one or more of the gene products encoded by one or more of the MID 4460 genes of the present invention, wherein these products can be associated with resistance of the cells to a therapeutic agent. Specifically, the activity of the proteins encoded by the MID 4460 genes of the present invention can be used as a basis for identifying agents for overcoming agent resistance. By blocking the activity of one or more of the resistance proteins, target cells, *e.g.*, human cells, will become sensitive to treatment with an agent to which the unmodified target cells were resistant.

[00372] Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs) on the expression or activity of a MID 4460 protein can be applied in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase MID 4460 gene expression, protein levels, or upregulate MID 4460 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased MID 4460 gene expression, protein levels, or downregulated MID 4460 activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease MID 4460 gene expression, protein levels, or downregulate MID 4460 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased MID 4460 gene expression, protein levels, or upregulated MID 4460 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a MID 4460 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for

WO 03/025199

PCT/US02/29353

example, a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disorder can be used as a "read out" or markers of the phenotype of a particular cell.

#### Other Embodiments

[00373] In another aspect, the invention features a method of analyzing a plurality of capture probes. The method is useful, *e.g.*, to analyze gene expression. The method includes: providing a two dimensional array having a plurality of addresses, each address of the plurality being positionally distinguishable from each other address of the plurality, and each address of the plurality having a unique capture probe, *e.g.*, a nucleic acid or peptide sequence, wherein the capture probes are from a cell or subject which expresses MID 4460 or from a cell or subject in which a MID 4460 mediated response has been elicited; contacting the array with a MID 4460 nucleic acid (preferably purified), a MID 4460 polypeptide (preferably purified), or an anti-MID 4460 antibody, and thereby evaluating the plurality of capture probes. Binding, *e.g.*, in the case of a nucleic acid, hybridization with a capture probe at an address of the plurality, is detected, *e.g.*, by a signal generated from a label attached to the MID 4460 nucleic acid, polypeptide, or antibody.

[00374] The capture probes can be a set of nucleic acids from a selected sample, *e.g.*, a sample of nucleic acids derived from a control or non-stimulated tissue or cell.

[00375] The method can include contacting the MID 4460 nucleic acid, polypeptide, or antibody with a first array having a plurality of capture probes and a second array having a different plurality of capture probes. The results of each hybridization can be compared, *e.g.*, to analyze differences in expression between a first and second sample. The first plurality of capture probes can be from a control sample, *e.g.*, a wild type, normal, or non-diseased, non-stimulated, sample, *e.g.*, a biological fluid, tissue, or cell sample. The second plurality of capture probes can be from an experimental sample, *e.g.*, a mutant type, at risk, disease-state or disorder-state, or stimulated, sample, *e.g.*, a biological fluid, tissue, or cell sample.

[00376] The plurality of capture probes can be a plurality of nucleic acid probes each of which specifically hybridizes, with an allele of MID 4460. Such methods can be used to diagnose a subject, *e.g.*, to evaluate risk for a disease or disorder, to evaluate suitability of a selected treatment for a subject, to evaluate whether a subject has a disease or disorder.

[00377] The method can be used to detect SNPs, as described above.

[00378] In another aspect, the invention features, a method of analyzing MID 4460, *e.g.*, analyzing structure, function, or relatedness to other nucleic acid or amino acid sequences. The method includes: providing a MID 4460 nucleic acid or amino acid sequence;

WO 03/025199

PCT/US02/29353

comparing the MID 4460 sequence with one or more preferably a plurality of sequences from a collection of sequences, *e.g.*, a nucleic acid or protein sequence database; to thereby analyze MID 4460.

**[00379]** The method can include evaluating the sequence identity between a MID 4460 sequence and a database sequence. The method can be performed by accessing the database at a second site, *e.g.*, over the internet. Preferred databases include GenBank™ and SwissProt.

**[00380]** In another aspect, the invention features, a set of oligonucleotides, useful, *e.g.*, for identifying SNP's, or identifying specific alleles of MID 4460. The set includes a plurality of oligonucleotides, each of which has a different nucleotide at an interrogation position, *e.g.*, an SNP or the site of a mutation. In a preferred embodiment, the oligonucleotides of the plurality identical in sequence with one another (except for differences in length). The oligonucleotides can be provided with differential labels, such that an oligonucleotide which hybridizes to one allele provides a signal that is distinguishable from an oligonucleotides which hybridizes to a second allele.

**[00381]** The sequences of MID 4460 molecules are provided in a variety of mediums to facilitate use thereof. A sequence can be provided as a manufacture, other than an isolated nucleic acid or amino acid molecule, which contains a MID 4460 molecule. Such a manufacture can provide a nucleotide or amino acid sequence, *e.g.*, an open reading frame, in a form which allows examination of the manufacture using means not directly applicable to examining the nucleotide or amino acid sequences, or a subset thereof, as they exist in nature or in purified form.

**[00382]** A MID 4460 nucleotide or amino acid sequence can be recorded on computer readable media. As used herein, "computer readable media" refers to any medium that can be read and accessed directly by a computer. Such media include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and magnetic tape; optical storage media such as compact disc and CD-ROM; electrical storage media such as RAM, ROM, EPROM, EEPROM, and the like; and general hard disks and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media. The medium is adapted or configured for having thereon MID 4460 sequence information of the present invention.

**[00383]** As used herein, the term "electronic apparatus" is intended to include any suitable computing or processing apparatus of other device configured or adapted for storing data or information. Examples of electronic apparatus suitable for use with the present invention



WO 03/025199

PCT/US02/29353

include stand-alone computing apparatus; networks, including a local area network (LAN), a wide area network (WAN) Internet, Intranet, and Extranet; electronic appliances such as personal digital assistants (PDAs), cellular phones, pagers, and the like; and local and distributed processing systems.

**[00384]** 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 MID 4460 sequence information.

**[00385]** A variety of data storage structures are available to a skilled artisan for creating a computer readable medium having recorded thereon a MID 4460 nucleotide or amino acid sequence of the present invention. The choice of the data storage structure will generally be based on the means chosen to access the stored information. In addition, a variety of data processor programs and formats can be used to store the nucleotide sequence information of the present invention on computer readable medium. The sequence information can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and Microsoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like. The skilled artisan can readily adapt any number of data processor structuring formats (*e.g.*, text file or database) in order to obtain computer readable medium having recorded thereon the nucleotide sequence information of the present invention.

**[00386]** By providing the MID 4460 nucleotide or amino acid sequences of the invention in computer readable form, the skilled artisan can routinely access the sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the invention in computer readable form to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. A search is used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

**[00387]** The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, wherein the method comprises the steps of determining MID 4460 sequence information associated with the subject and based on the MID 4460 sequence information, determining whether the subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or

WO 03/025199

PCT/US02/29353

disorder and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00388] The present invention further provides in an electronic system and/or in a network, a method for determining whether a subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a disease associated with MID 4460, wherein the method comprises the steps of determining MID 4460 sequence information associated with the subject, and based on the MID 4460 sequence information, determining whether the subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition. The method may further comprise the step of receiving phenotypic information associated with the subject and/or acquiring from a network phenotypic information associated with the subject.

[00389] The present invention also provides in a network, a method for determining whether a subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving MID 4460 sequence information from the subject and/or information related thereto, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to MID 4460 and/or corresponding to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the MID 4460 information (*e.g.*, sequence information and/or information related thereto), and the acquired information, determining whether the subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

[00390] The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving information related to MID 4460 (*e.g.*, sequence information and/or information related thereto), receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the

WO 03/025199

PCT/US02/29353

network related to MID 4460 and/or related to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the MID 4460 information, and the acquired information, determining whether the subject has a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder or a pre-disposition to a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

**[00391]** The invention also includes an array comprising a MID 4460 sequence of the present invention. The array can be used to assay expression of one or more genes in the array. In one embodiment, the array can be used to assay gene expression in a tissue to ascertain tissue specificity of genes in the array. In this manner, up to about 7600 genes can be simultaneously assayed for expression, one of which can be MID 4460. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

**[00392]** In addition to such qualitative information, the invention allows the quantitation of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression in that tissue. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. In this context, the effect of one cell type on another cell type in response to a biological stimulus can be determined. Such a determination is useful, for example, to know the effect of cell-cell interaction at the level of gene expression. If an agent is administered therapeutically to treat one cell type but has an undesirable effect on another cell type, the invention provides an assay to determine the molecular basis of the undesirable effect and thus provides the opportunity to co-administer a counteracting agent or otherwise treat the undesired effect. Similarly, even within a single cell type, undesirable biological effects can be determined at the molecular level. Thus, the effects of an agent on expression of other than the target gene can be ascertained and counteracted.

**[00393]** In another embodiment, the array can be used to monitor the time course of expression of one or more genes in the array. This can occur in various biological contexts, as disclosed herein, for example development of a tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder, progression of tyrosine phosphatase-associated or

WO 03/025199

PCT/US02/29353

another MID 4460-associated disease or disorder, and processes, such a cellular transformation associated with the tyrosine phosphatase-associated or another MID 4460-associated disease or disorder.

[00394] The array is also useful for ascertaining the effect of the expression of a gene on the expression of other genes in the same cell or in different cells (*e.g.*, ascertaining the effect of MID 4460 expression on the expression of other genes). This provides, for example, for a selection of alternate molecular targets for therapeutic intervention if the ultimate or downstream target cannot be regulated.

[00395] The array is also useful for ascertaining differential expression patterns of one or more genes in normal and abnormal cells. This provides a battery of genes (*e.g.*, including MID 4460) that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

[00396] As used herein, a "target sequence" can be any DNA or amino acid sequence of six or more nucleotides or two or more amino acids. A skilled artisan can readily recognize that the longer a target sequence is, the less likely a target sequence will be present as a random occurrence in the database. Typical sequence lengths of a target sequence are from about 10 to 100 amino acids or from about 30 to 300 nucleotide residues. However, it is well recognized that commercially important fragments, such as sequence fragments involved in gene expression and protein processing, may be of shorter length.

[00397] Computer software is publicly available which allows a skilled artisan to access sequence information provided in a computer readable medium for analysis and comparison to other sequences. A variety of known algorithms are disclosed publicly and a variety of commercially available software for conducting search means are and can be used in the computer-based systems of the present invention. Examples of such software include, but are not limited to, MacPattern (EMBL), BLASTN and BLASTX (NCBI).

[00398] Thus, the invention features a method of making a computer readable record of a sequence of a MID 4460 sequence which includes recording the sequence on a computer readable matrix. In a preferred embodiment the record includes one or more of the following: identification of an ORF; identification of a domain, region, or site; identification of the start of transcription; identification of the transcription terminator; the full length amino acid sequence of the protein, or a mature form thereof; the 5' end of the translated region.

[00399] In another aspect, the invention features a method of analyzing a sequence. The method includes: providing a MID 4460 sequence, or record, in computer readable form; comparing a second sequence to the MID 4460 sequence; thereby analyzing a sequence. Comparison can include comparing to sequences for sequence identity or determining if one

WO 03/025199

PCT/US02/29353

sequence is included within the other, *e.g.*, determining if the MID 4460 sequence includes a sequence being compared. In a preferred embodiment the MID 4460 or second sequence is stored on a first computer, *e.g.*, at a first site and the comparison is performed, read, or recorded on a second computer, *e.g.*, at a second site. *E.g.*, the MID 4460 or second sequence can be stored in a public or proprietary database in one computer, and the results of the comparison performed, read, or recorded on a second computer. In a preferred embodiment the record includes one or more of the following: identification of an ORF; identification of a domain, region, or site; identification of the start of transcription; identification of the transcription terminator; the full length amino acid sequence of the protein, or a mature form thereof; the 5' end of the translated region.

**[00400]** This invention is further illustrated by the following exemplification, which should not be construed as limiting.

#### EXEMPLIFICATION

##### Gene Expression Analysis

**[00401]** Total RNA was prepared from various human tissues by a single step extraction method using RNA STAT-60 according to the manufacturer's instructions (TelTest, Inc). Each RNA preparation was treated with DNase I (Ambion) at 37°C for 1 hour. DNase I treatment was determined to be complete if the sample required at least 38 PCR amplification cycles to reach a threshold level of fluorescence using  $\beta$ -2 microglobulin as an internal amplicon reference. The integrity of the RNA samples following DNase I treatment was confirmed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. After phenol extraction cDNA was prepared from the sample using the SUPERScript™ Choice System following the manufacturer's instructions (GibcoBRL). A negative control of RNA without reverse transcriptase was mock reverse transcribed for each RNA sample.

**[00402]** Human MID 4460 expression was measured by TaqMan® quantitative PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems) in cDNA prepared from a variety of normal and diseased (*e.g.*, cancerous) human tissues or cell lines.

**[00403]** Probes were designed by PrimerExpress software (PE Biosystems) based on the sequence of the human MID 4460 gene. Each human MID 4460 gene probe was labeled using FAM (6-carboxyfluorescein), and the  $\beta$ 2-microglobulin reference probe was labeled with a different fluorescent dye, VIC. The differential labeling of the target gene and internal reference gene thus enabled measurement in same well. Forward and reverse primers and the

WO 03/025199

PCT/US02/29353

probes for both  $\beta$ 2-microglobulin and target gene were added to the TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). Although the final concentration of primer and probe could vary, each was internally consistent within a given experiment. A typical experiment contained 200nM of forward and reverse primers plus 100nM probe for  $\beta$ -2 microglobulin and 600 nM forward and reverse primers plus 200 nM probe for the target gene. TaqMan matrix experiments were carried out on an ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). The thermal cycler conditions were as follows: hold for 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by two-step PCR for 40 cycles of 95°C for 15 sec followed by 60°C for 1 min.

**[00404]** The following method was used to quantitatively calculate human MID 4460 gene expression in the various tissues relative to  $\beta$ -2 microglobulin expression in the same tissue. The threshold cycle (Ct) value is defined as the cycle at which a statistically significant increase in fluorescence is detected. A lower Ct value is indicative of a higher mRNA concentration. The Ct value of the human MID 4460 gene is normalized by subtracting the Ct value of the  $\beta$ -2 microglobulin gene to obtain a  $\Delta$ Ct value using the following formula:  $\Delta$ Ct = Ct<sub>human 59914 and 59921</sub> - Ct <sub>$\beta$ -2 microglobulin</sub>. Expression is then calibrated against a cDNA sample showing a comparatively low level of expression of the human MID 4460 gene. The  $\Delta$ Ct value for the calibrator sample is then subtracted from  $\Delta$ Ct for each tissue sample according to the following formula:  $\Delta\Delta$ Ct =  $\Delta$ Ct<sub>sample</sub> -  $\Delta$ Ct<sub>calibrator</sub>. Relative expression is then calculated using the arithmetic formula given by  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Expression of the target human MID 4460 gene in each of the tissues tested is then graphically represented as discussed in more detail below.

**[00405]** The results indicate significant MID 4460 expression in heart, pancreas, brain, colon, liver, spleen, and small intestine (see Tables below).

Phase 1.4.3 Expression of 4460.1 with beta2	
Tissue	Expression
Artery, normal	0.165
Vein, normal	0
Aortic SMC Early	0.8327
Coronary SMC	1.1694
Static HUVEC	0.1216
Shear HUVEC	0.4766
Heart, normal	3.3538
Heart, CHF	0.5609
Kidney	0.2155
Skeletal Muscle	0.1524

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Adipose, normal	0.0554
Pancreas	4.03
Primary osteoblasts	0
Osteoclasts (diff.)	0
Skin, normal	0.0837
Spinal cord, normal	6.9441
Brain, cortex normal	7.0167
Brain, hypothalamus	5.9208
Nerve	0.0845
DRG (Dorsal root ganglion)	1.9196
Resting PBMC	0
Glioblastoma	0.2728
Breast, normal	0.6288
Breast, tumor	0.2125
Ovary, normal	0.4832
Ovary, tumor	0.1078
Prostate, normal	0.1393
Prostate, tumor	0.2358
Epithelial cell (Prostate)	1.0251
Colon, normal	14.885
Colon, tumor	24.7745
Lung, normal	0.0242
Lung, tumor	4.0721
Lung, COPD	0.0517
Colon, IBD	12.5602
Liver, normal	5.6796
Liver, fibrosis	9.585
Dermal cells-fibroblasts	0.1139
Spleen, normal	6.8723
Tonsil, normal	0.0236
Lymph node	0.0135
Small Intestine	4.8426
Skin, decubitus	0
Synovium	0.1336
BM-MNC (Bone marrow)	0.0027
Activated PBMC	0

4460.1 Expression in Human Liver Panel	
Tissue	Expression
PTT 278/Heart	10.0616
PTT 351/Kidney	0.6647
PTT 915/Skeletal Muscle	0.7769
NDR 63/Liver/Normal	17.9484
NDR 242/Liver/Normal	8.0321
PTT 260/Liver/Normal	9.8545
CHT 756/Liver/Normal	7.9491
MPI 146/Liver/Normal	11.164
CHT 902/Liver/Normal	6.6843

WO 03/025199

PCT/US02/29353

CHT 1679/Liver/Normal	5.9826
CHT 1420/Liver/Normal	9.0054
CHT 339/Liver/Normal	7.6783
CHT 1237/Liver/Normal	3.6447
PIT 45/Liver/Diseased	10.0268
PIT 292/Liver/Diseased	22.8763
CLN 784/Liver/Diseased	3.9608
NDR 752/Liver/Diseased	11.0103

[00406] The contents of all references, patents and published patent applications cited throughout this application are incorporated herein by reference.

#### Equivalents

[00407] Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents to the specific embodiments of the invention described herein.



WO 03/025199

PCT/US02/29353

What is claimed is:

1. A method of identifying a nucleic acid molecule associated with a pathological disorder selected from the group consisting of:
  - a) contacting a sample comprising nucleic acid molecules with a hybridization probe comprising at least 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 OR 3; and detecting the presence of a nucleic acid molecule in said sample that hybridizes to said probe, and
  - b) contacting a sample comprising nucleic acid molecules with a first and a second amplification primer, said first primer comprising at least 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 OR 3, and said second primer comprising at least 25 contiguous nucleotides from the complement of SEQ ID NO:1 OR 3; incubating said sample under conditions that allow nucleic acid amplification; and detecting the presence of a nucleic acid molecule in said sample that is amplified,thereby identifying a nucleic acid molecule associated with a pathological disorder.
2. A method of identifying a polypeptide associated with a pathological disorder comprising:
  - a) contacting a sample comprising polypeptides with a 4460 binding substance; and
  - b) detecting the presence of a polypeptide in said sample that binds to said 4460 binding substance, thereby identifying a polypeptide associated with a pathological disorder.
3. A method of identifying a subject having a pathological disorder, or at risk for developing a pathological disorder selected from the group consisting of:
  - a) contacting a sample obtained from said subject comprising nucleic acid molecules with a hybridization probe comprising at least 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 OR 3; and detecting the presence of a nucleic acid molecule in said sample that hybridizes to said probe; and
  - b) contacting a sample obtained from said subject comprising nucleic acid molecules with a first and a second amplification primer, said first primer comprising at least 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 OR 3, and said second primer comprising at least 25 contiguous nucleotides from the complement of SEQ ID NO:1 OR 3; incubating

WO 03/025199

PCT/US02/29353

said sample under conditions that allow nucleic acid amplification; and detecting the presence of a nucleic acid molecule in said sample that is amplified;

thereby identifying a subject having a pathological disorder, or at risk for developing a pathological disorder.

4. A method of identifying a subject having a pathological disorder, or at risk for developing a pathological disorder comprising:

a) contacting a sample obtained from said subject comprising polypeptides with a 4460 binding substance; and

b) detecting the presence of a polypeptide in said sample that binds to said 4460 binding substance, thereby identifying a subject having a pathological disorder, or at risk for developing a pathological disorder.

5. A method for treating a subject having a pathological disorder or a pathological disorder characterized by aberrant 4460 polypeptide activity or aberrant 4460 nucleic acid expression comprising administering to the subject a 4460 modulator, thereby treating said subject having a pathological disorder.

6. The method of claim 5 wherein the modulator is selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polynucleotides and antibodies.

7. The method of any of claims 1-5 wherein the pathological disorder is a cardiovascular disorder.

8. A method of detecting an agent that binds a 4460 polypeptide comprising:

a) combining an agent selected from the group consisting of small organic molecules, peptides, polynucleotides and antibodies; and

b) detecting or measuring the formation of a complex between the agent and the 4460 polypeptide under conditions suitable for binding of an agent to the 4460 polypeptide, to thereby identify an agent that binds to the 4460 polypeptide.

9. The method of claim 7 wherein the agent is a modulator of 4460 polypeptide activity.

PCT/US02/29353

[illegible]

**FIGURE 1A**

WO 03/025199

PCT/US02/29353

GGCGCCATCCAGGCCACAAAGTTGGAGGTCCTAAGTGACGAGGGGGCTGGGTCCGACGCC  
 CAGGCATCCTCAAGCTCTGGACACCCACTTGAGCCAGATTCTCGAAGAGCAGAGGGCT  
 GGGCTCCAGACTCCTGGGTGCTGTGGAGAGGGGGCTGGTATCCCAAACCTGGTTTC  
 CCCAGGAGAGAGTGGTCTGGTGGGCTTCAGATGAGTCCATGGGAGCTGGGGATCTGGM  
 TCCTGGTTCCTGAAGGAGGAGAGGATGATAGCTTGGATTCCCTAGGCTTTTCCAGGAT  
 GCAGAAAGAAACAGGCTGGGGCTCGGATCTGAGGCAGGAAGGAATTTGGGTCTGGAGTT  
 CTGGCTACTTGGAGACCAGAGGCAGGAAGGATCCTGCTTGATTTTACTTCAGAAACAA  
 ATCAGTCTTCTATAATCTGGGTCGGAGGGAGTCCCTGTGCCAAGGCTCTCTGCACCC  
 CACCATCCACATGATTTTTCCTTCTATCCATAATTTATTAATCACTGTTCCTCCACG

### Predicted Amino Acid Sequence of MID 4460 (SEQ ID NO:2)

MAGAGGGLGVWGNVLLGLCSWTGARAPAPNPGRNLTIVETQTTSSISLSWEVDPGLDSQN  
 SNVWVCTGDDGGTCTHNTTATNVTVDGLSPGSLYTCSVWVEKDGVNSSVGTVTTATAPN  
 PVRNLVBAQTNSSTALTWEVDPDGPQNSTYGVETTDGGRAGTRSTAHNTTVDGLEP  
 GCLYAFSMWVGKNGINSRETRNATTAHNPVKPESGSDHQLHLPGLGPRMHRPTELD  
 LLRTSALRMVAEQRLETQQTPESPVDGLGFGSLYTCVWVEKDGVNSSSWRLVTSTAPN  
 PVRNLVEAQINSSTALTWEVDPDGPQNSTYGVETTDGGRAGTRSTAHNTTVDRLFP  
 GCLYVFSVMVGKNGINSRETRNATTAHNPVRNLHMETQNSSTALCWEVDPGYPQDYT  
 YWVGYTGDGGGTETRNNTNTSVTABRLEPGTLTYTFSVWAEKNGARSRQNVISITVPNAV  
 TSLSKQWNTSTLALRWTAAPGPGQSSSTVWVWVEGMDTPRTYSTSTDTITLKELEAG  
 SLHLVWVAERNEVFGVNTTAAATPHEVTDLQNETQTKNVMMLMKAPGDHSLYVY  
 WQWASKGHPRRQDPQANWVNTSRTNNEWYKVEALEPGTLYHFTVNAERNDVASSTQS  
 LCASITYPDIVITSCVSTAGYGVNLINSCPGGYEAFELVVGQRGSQDRSSCGEAVSV  
 LGLGPARYPATITTTWDMKVVSHSVVCHTESAGVLAGAFVIGILLFLILVGLLIFFLKR  
 RNKKQKQKPELRDLVFPSSPGDI PAEDFADHVRKNERDSNCGFADEVQQLSLVGHSSQSMV  
 ASASENNAKNRYRNVL FYDWSRVPLKPLHEEPGSDYINASFMPGLWSQPEFIATQGLPQ  
 TVGDFWRLVWEQSHTLVMLTNCMRAGRVCHEWYPLDSQPCPTHGLHRLVTLVGBVMENN  
 TVRRLLLQVBEKTLVSRQTHQWMPHVVSSPDTLLAFWRMLRQWLDQTHPGGFPPIV  
 HCSAGVGRGTGILIALDVLLRQLSEBLLGPFSFVRKMRRESRPLWVQTEAQTVEFLHQCTCG  
 SNSQPRPQPRKSRMRMKSSTSTWTFPSRPTSWRSK

### Coding Sequence for GPCR 18636 (SEQ ID NO:3)

ATGGCTGGGGCTGGCGGGG  
 GCCTCGGGGTCTGGGGGAACCTGGTGCTGCTGGGCCCTGTGCAGCTGACACAGGGGCCAGGG  
 CGCCTGCCCCCAACCCAGGGAGGAACCTGACAGTGGAGACTCAGACCAACAGCTCCATCT  
 CCTGAGCTGGGAGGTCCCGGATGGCTAGACTCAGAACTCCAACTACTGGGTTCAGT  
 GTACTGGAGACGGCGGCACAACAGAGACTCGAAACACAACAGCCACCAACCTCAOCCGTGG  
 ATGGCCTTGGACCGCGGTCAATTGTATACGTGTTCTGTGTGGGTGGAGAAAGAGGAGTAA  
 ATAGCTCTGTGGGGACTGTCTACTACTGCCACAGCTCCCAACCAAGTGAAGGAOCTGAGAG  
 TGGAGGCTCAGACCAACAGCTCCATCGCCCTGACCTGGGAGGTCCCGACCGGCCAGAGCC  
 CACAGAACTCCACCTACCGGGTTGAGTACACTGGAGATGGTGGCAGAGCAGGGACTCGAA  
 GCACAGCACACACTAACATACCGTGGATGGACTTGAACCCGGGTGTTTGTATGCGTTTTT  
 CCATGTGGGTGGGAAGAAATGGAATCAACAGCTCCCGGAGACTCGAAATGCCACACAG  
 CTCCACACCCAGTGAGGAACCTGAGAGTGGAGGCTCAGACCCACAGCTCCATCTCCCTG  
 AGCTGGAGGCTCCCGGATGGCACTAGACCCACAGAACTCGACCTACTGCTACAGAGTGCAC  
 TGGAGATGTTGCCAGACAGAGACTCGAAACACACAGCACACAGAGTCAACAGTGGATG  
 GCCTTGGACCGGGTCAATTGTATACCTGTTCTGTGTGGGTGGAGAAAGACGGAGTAAATA  
 GCTCTCTGTGGAGATGTGTACTAGTACACAGCTCCCAACCAAGTGAAGAACTGACAG  
 TGGAGGCTCAGACCAACAGCTCCATCGCCCTGACCTGGGAGGTCCCGATGGCCAGACC  
 CACAGAACTCCACCTACCGGGTTGAGTACACTGAGAGATGCTGGAGGCTCGAA  
 GCACAGCACACCAACATACCGTGGATGAGACTTGAACCCGGGTGTTGTATGTGTTT  
 CCSTGTGGGTGGGAGAAATGGAATCAACAGCTCCCGGAGACTCGAAATGCCACACAG  
 CCCCCAACCCAGTGAGAAACCTCCATATGAGAGACTCAGACCTACAGCTCCATCGCCCTAT  
 GCTGGGAAGTCCCGGATGGCCATACCTCAGGACTACACCTACTGGCTAGGGTACACTG  
 GAGACGCTGGTGGCACAGAGCCCGAAACACAACAAATACCAAGTGTGACAGCTGAGAGAC

FIGURE 1B

WO 03/025199

PCT/US02/29353

TTGAGCCCGGAACTCTACACATTTCTCTGTATGGGACAGAAAAAATGGAGCAGTGGCT  
 CCAGGCAGNATGTACGACATCTCCACAGTCCCAACCCAGTACAGAACCTCAGCAGCAGG  
 ACTGGACCAACAGCACCATTGCTTTGGCGTGGACAGCTCCCAAGGCCCCAGGCCAGTCTTT  
 CCTACAGCTACTTGGGTCTCAATGGGTACAGGGAAGGCATGACTGACCCCAAGACCAAGCG  
 CCTCAGGTACTGACATCACCTTAAGGAACCTGAAGCTGGCAGCCTGTACCACTCAACCG  
 TCTGGGCCGAGAGGAAATGAGTCAAGGCCTATAACAGCACCCTCACTGACGCCACTGCTC  
 CCAATGAGGTACAGATCTCCAGAAATGAAGTCAAGACTAAGAACTCACTCATGCTGTGGT  
 GGAAGGCCCTTGGAGACCTCCACTCTCAAGTTGTACGTATACTGGGTCCAGTGGGCCAGCA  
 AGGACATCCCCGAGGGGCAAGATCCCCAAGCGAATGGGTCAACCAAGACCAAGCAAGGA  
 CCAATGAGAGCTGTACAAAGTGGAGGCCCTGGAAACCCGGGACGTTGTACAATTTACCG  
 TGTGGCCAGAGGGAATGACCTAGCCAGTTCCACGCAAGGCCTCTGTGCGTCCCATATCC  
 CAGACACAGTACCACTCACTTCTGTGTACAGCACTCAGCGGCTATGTGAGTCAACTTGA  
 TCTGGTCTCTCCCCAGGGAGGCTACGAGGCCCTTTGAGTTGGAGGTGGGAGGACGCGGG  
 GCTCCAGGACAGATCTTATCTGGGAGGCTGTGTCTGTGTGGGTCTCGGGCCGCTC  
 GGTCCTACCCAGCCACCATCAGCAGCATCTGGGACGGAATGAAGTCTGTCTCACTCTG  
 TGGTCTGCCACACCGAGAGTGCAGGGCTCAATGCCCGAGCCTTTGTGGCATCTCCTCTGT  
 TTCTCATCTCTGTGGGCTTGTCTGATTTCTCTCTGAGAGGAGGAATAAGAAAGCAGC  
 AGAAACAGAACTCAGGGATCTGGTCTTTAGCTCCCAAGGGACATCCCACTGAAGACT  
 TCGCTGACCACTCAGGAAGATGAGAGGACAGCAACTGTGCTTTTGCAGACGAGTACC  
 AGCAACTCTCCTGTGGGCCACAGCCAGTCTCAGATGTTGGCTTCGGCTTCAGAGAACCA  
 AGCCAAAGAACCCCTACAGAAATGTCTGCTTATGACTGTTCCGGGTGCCCTGAAAGC  
 CCATCCATGAGGAGCCAGGCTCTGACTACATCAATGACAGCTTCAATGCCGCTCTGGA  
 GCGCCAGGAGTTCATTGCAACCCAGGCTCCCTGCCACAGACAGTGGGTGACTTCTGGC  
 GCTGCTGTGGGACACAGAGGCCACACCTTGGTCTATGCTGACCACTGCATGGAGGCCG  
 GCGGGTGAAGTGTAGCATTTACTGGCTCTGGACTGCGAGCCCTGCCACCATGGGCACC  
 TCGGGTAACCTTGTAGGTGAGGAAGTGTGGAGAACTGGAGCGTGGGAACTGCTGCT  
 TCTCCAGGTGGAGGACAGAAAGACTGCTGTGCGCCATTTCCACTACCAAGCCTGGC  
 CGGATCAGCGCTTCTCTCTCCCAAGACCTTGTGGCTTTCTGGAGGATGCTTCCGC  
 AGTGGCTGATCAGACCATGGAGGAGGCCACCCATGTGTGACTGCGAGTGTGGCTGG  
 GTGCGACAGGAACCTCATTTGCCCTGGACCTCTGCTCCGGCAGCTGAGTCCGAGGGT  
 TCTTTGGGCCCTTCACTTTGTAAGGAAGATGAGAGAGTGGGCCCTGTGATGTGCGAGA  
 CTGAGGCTCAGTACGTATTCTGCTGATCAGTGCATCTGCGGTTCCTCCACAGTCAAGCCA  
 GGCCCCAGCCGAGAGGAAGTCCCTGATGAGGAATGCGAAACCTCATCTACGAGAACGT  
 GGCGCCATCCAGGCCACAAAGTTGGAGGTCTAAGTGA

#### Amino Acid Sequence of Mature Form of MID 4460 (SEQ ID NO:4)

RAPAPNPGRNLTIVETQTTSSISLSWEPDGLDSQNSNYWVQCTGDDGTTETRNNTAINVT  
 VDGLPGSLYTCSVWVERDGVNSSVGTVTTATAPNPNVRLRVEAQTNSSIALTWEVDPDG  
 DPQNSTVGVBYTCDGGRAGTRSTAHTNITVDGLEPGCLYAFSMWVGRNGINSRERTRNAT  
 TAHNPNVRKPESSGGSDHQLHLPGLGPRWHRPTELDLLRTSALEMVAEQRLSTQQTTPRSPV  
 DGLGPGSLYTCSVWVERDGVNSSVRLVTSITAPNPNVRLRVEAQTNSSIALTWEVDPDG  
 DPQNSTVGVBYTCDGGRAGTRSTAHTNITVDGLEPGCLYAFSMWVGRNGINSRERTRNAT  
 TAPNPNVRLRVEAQTNSSIALTWEVDPDGPDYTVWVGTGDDGTTETRNNTAINVTAE  
 RLEPGTLTYFSVWAEKNGARGSRQNSISVFNATVSLSKQDWTNSTIALRWTAPOGPGQ  
 SSYSYVWVNRGMDTPRTQSTSTCTDITLKELEAGSLYHLTVWAEERNEVRGYNSTLTAAT  
 APNEVTDLQNETQTKNSVMLWKA PGDPHSQLYVYVWQWASKCHPRRQDPQANWVNTS  
 RTNETWYKVBALPEGTLYNFTVWAEERNDVASTQSLCASTYPDVTITSCVSTSGYGVN  
 LIWSCPGGYEAFELVGGQGRSGDRSSCGEAVSVLGLGPARSYPATITTTIWDGKVVVSH  
 SVVCHTESAGVTAGAFVGLLLFLVGLLIFFLKRRKKKQRPRLADLVFSSPGDTAE  
 DPAHYRKNERNENCGADEYQQLSLVGHGQQQWVASASTENAKIRYRNILPYDWSRVP  
 KPIHEEPGSDYINASFMPGLMSPOEFIAQCPLPQTVGDFWRLVWEGQSHLVMNLNOME  
 AGRVKCEHYWELDSQPCTHGLRVTLVGBEVMENWTVRELLLLQVBEQKTLVSRQFHYQA  
 WPDHGVPSPPDILLAFWRMLRQMLDQTMEGGPPIVHCSAGVGRGTGLIALDLVLRQLQSE  
 GLLGPFPSVRKMERBSPRLMVQTEAQYVFLHQICGSSNSQPRFQPRKSRMRMKSSTSR  
 TWPPSRPTSWRSK

FIGURE 1C

WO 03/025199

PCT/US02/29353

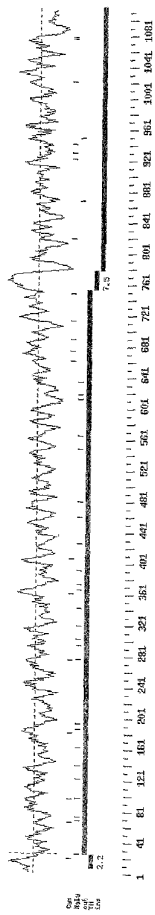


FIGURE 2

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Protein Family / Domain Matches, HMMer version 2

Searching for complete domains in PFAM  
 hmmpfam - search a single seq against HMM database  
 HMMER 2.1.1 (Dec 1998)  
 Copyright (C) 1992-1998 Washington University School of Medicine  
 HMMER is freely distributed under the GNU General Public License (GPL).

HMM file: /prod/dcm/seganal/PFAM/pfam6.2/Pfam  
 Sequence file: /prod/dcm/wspccc/orfanal/oa-script.20761.seq  
 Query: 4460

Scores for sequence family classification (score includes all domains):

Model	Description	Score	E-value	N
Y_phosphatase	Protein-tyrosine phosphatase	396.1	3.5e-115	1
fn3	Fibronectin type III domain	153.6	3.4e-42	6

Parsed for domains:

Model	Domain	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	score	E-value
fn3	1/6	28	108	1	84	35.2	1.5e-06
fn3	2/6	119	201	1	84	35.2	1.5e-06
fn3	3/6	299	381	1	84	36.1	7.9e-07
fn3	4/6	388	469	1	84	27.1	0.00042
fn3	5/6	477	559	1	84	22.7	0.0089
fn3	6/6	567	656	1	84	35.2	1.5e-06
Y_phosphatase	1/1	846	1080	1	264	396.1	3.5e-115

Alignments of top-scoring domains:

fn3: domain 1 of 6, from 28 to 108: score 35.2, E = 1.5e-06

```

*->P.sap.knlitvtdvtstaltlsWsppt.gngpitgYevtyRqpkngg
P + P+nlitv+ +t++s++lw+ p++ ++ +Y v++ +g
4460 28 PaFNPGRNLTVSTQITSSISLSWEVVDGLDSQNSNYWVQC-T--GDG 71
      evmltvpgtttstytltgkPgteYevrVgAvnggGGpeS-+
+++e + + t +t+ gl Pg+ Y+ +V +g S
4460 72 GTTETRTTAT-NVTVDGLGPGSLVTCVWVERKQ--VNS 108

```

fn3: domain 2 of 6, from 119 to 201: score 35.2, E = 1.5e-06

```

*->P.sap.knlitvtdvtstaltlsWsppt.gngpitgYevtyRqpkngg
P +++nlv++t +s+ l+W+ p+++ + Y v+y +g+
4460 119 PNFVRNLVRAQTNSIALTWEVDPGPDFQNSTYGVY-T--GDGR 162
      neltvpgtttstytltgkPgteYevrVg.AvnggG.GpeS-+
+ .+ +t + t+ gl+Pg Y++ ng+ +++e+
4460 163 AGTRSTANT-NITVDGLEPGCLYAFSMWVGKNGINSRET 201

```

fn3: domain 3 of 6, from 299 to 381: score 36.1, E = 7.9e-07

```

*->P.sap.knlitvtdvtstaltlsWsppt.gngpitgYevtyRqpkngg
P +++nlv++t +s+ l+W+ p+++ + Y v+y +g+
4460 299 PNFVRNLVRAQTNSIALTWEVDPGPDFQNSTYGVY-T--GDGR 342
      neltvpgtttstytltgkPgteYevrVg.AvnggG.GpeS-+
+ +t + t+ l+Pg Y++V ng+ +++e+
4460 343 AGTRSTANT-NITVDGLEPGCLYAFSMWVGKNGINSRET 381

```

fn3: domain 4 of 6, from 388 to 469: score 27.1, E = 0.00042

```

*->P.sap.knlitvtdvtstaltlsWsppt.gngpitgYevtyRqpkngg
P +++nl+ +t +s+ l W+ p+++ Y v y +gg
4460 388 PNFVRNLHMYQTNSIALCWEVDPGFYFQDTYMWGY-TGDGGG-- 431
      neltvpgtttstytltgkPgteYevrVgAvnggG.GpeS-+
+e + +t s+t + L+Pg Y++V A +g +G +
4460 432 TETRTTNT-SVTAERLEPGTLTFPSVNAEKNGARQSRQ 469

```

fn3: domain 5 of 6, from 477 to 559: score 22.7, E = 0.0089

```

*->P.sap.knlitvtdvtstaltlsWsppt.gngpitgYevtyRqpkngg
P a+t l+ d t +++ l+W+p +++ +Y v++ ++ ++

```

FIGURE 3A

WO 03/025199

PCT/US02/29353

```

4460 477 PNAVTSLSKQDWNTSTIALRWTAQgPQSSSYVWVSW-VREGMTDP 522
      neltvpgttstytltgkPgtoYevrVqAvnggG.GpeS<-*
      ++++++gt    tl+ l+ig+ Y+++V A  ++ +G S
4460 523 RQSTSGTD---ITLKELEAGSLYHLTVMAERNEVrGYNS 559
fn3: domain 6 of 6, from 567 to 656: score 35.2, E = 1.5e-06
      *->PsaPtnltvtststltleWsppt.gngpigtYevtyRqpkngge.
      P +t+tl+ + +t +s+ l W+tp +++++ Y v++ +k+++ +
4460 567 FNEVTDLQNErQrKNSVZLAWKAFOGFHSQLVYVWVQW-ASKGHPPr 612
      .....wneltvpgttstytltgkPgtoYevrVqAvnggG.GpeS<-*
      ++++++ +w++++ +t y ++ l+Bgt Y+++V A  ++ +S
4460 613 gqdpqanWVNGTSSrTNGTWYKVEALEPGLYNFTVMAERND--VAS 656
Y_phosphatase: domain 1 of 1, from 846 to 1080: score 396.1, E = 3.5e-115
      *->NckKNRvkdILFYDhsRVkLtpidgeegSDYINAsyIkyIdGykqkk
      N ENRY+++LPYD sRV l+pl +tgSDYINAs +++G ++
4460 846 NNAKARVrRVLPFLWRSVFLKFIHEEPQSDYINAs---FMPGLWSPQ 889
      asYIATQGFLpSntVesDFWRMvWRMqnsaiIVMlTrlvBrgrKCdqYWP
      + +IATQGFLp Tv+DPWR vWE q s++ VMLT++ E+gr+KC +YWP
4460 890 E-FIATQGFLp-QrVGDpWRUVWR-QQSTLVMLTNCMEAGRvKCBHYWP 936
      deggeEndsetyGdisVllkeevvledytvRtlolntgagegQdkerd
      + ++t+q+++vtl+ eev +s +tvr+l l + +
4460 937 LDSQ-----FCTHGLRLVTLVGBEV-MBNWTVRRLLLQVEEQ----- 973
      etRvtqthytWpDhrvPespksllkfiqrkvksqeqsapsaGasdgP
      +t+ v+qfhy +WPDh gvP+sp+ ll+f x r + +q+ + gP
4460 974 KTLsVRQPHYQAWPDh-GVPSSFDTLAFAVRMLRQMLDQTMESG-----GP 1017
      iVHCSAGvGRtGWFialdinleqleagppsDvVdvfgtVkslRsQRpg
      +VHCSAGvGRtGWFiald +l ql++eg + +f +V+++R Rp
4460 1018 FIVHCSAGvGRtGFLIALDVLRLQIQSEG----LLGPPSPVRKMRBSRPL 1063
      mVQTe+QvVFiYdaile<-*
      mVQTe+QvVFiYdaile<-*
4460 1064 MVQTEAQVVFELKQICG 1080

```

FIGURE 3B



WO 03/025199

PCT/US02/29353

```
View Prodom PD312226
>PD312226 p2001.1 (1) // H PHOSPHATASE TYROSINE TRANSMEMBRANE-TYPE
Length = 217

Score = 1181 (420.8 bits), Expect = 3.9e-120, P = 3.9e-120
Identities = 217/217 (100%), Positives = 217/217 (100%)

Query:  540 GSLYHLTVWAERNRVRGYNSTLTAAATAPNEVTDLQNETQTKNSVMLNWKAFGDPHSQLYV 599
        1 GSLYHLTVWAERNRVRGYNSTLTAAATAPNEVTDLQNETQTKNSVMLNWKAFGDPHSQLYV 60
Sbjct:  1  GSLYHLTVWAERNRVRGYNSTLTAAATAPNEVTDLQNETQTKNSVMLNWKAFGDPHSQLYV 60

Query:  600 YWVQWASKGHPERGGQDPQANWVWQTSRTNETHYKVSALRPGTLVNFVWAERNNDVASSTQ 659
        61 YWVQWASKGHPERGGQDPQANWVWQTSRTNETHYKVSALRPGTLVNFVWAERNNDVASSTQ 120
Sbjct:  61  YWVQWASKGHPERGGQDPQANWVWQTSRTNETHYKVSALRPGTLVNFVWAERNNDVASSTQ 120

Query:  660 SLCASTYFDIVTITSCVSTTSAGYGVNLIWSCPQGGYEAFLELVGGQSGQDRSSCGEAYS 719
        121 SLCASTYFDIVTITSCVSTTSAGYGVNLIWSCPQGGYEAFLELVGGQSGQDRSSCGEAYS 180
Sbjct:  121  SLCASTYFDIVTITSCVSTTSAGYGVNLIWSCPQGGYEAFLELVGGQSGQDRSSCGEAYS 180

Query:  720 VLGLGPARSYPATTTIWDGMKVVSHSVCHTSAGV 756
        VLGLGPARSYPATTTIWDGMKVVSHSVCHTSAGV
Sbjct:  181  VLGLGPARSYPATTTIWDGMKVVSHSVCHTSAGV 217
```

FIGURE 4

WO 03/025199

PCT/US02/29353

>gi|475004|dbj|BAA03645| (D15049) protein tyrosine phosphatase precursor [Homo sapiens] >pir|A49724|A49724 protein-tyrosine-phosphatase (BC 3.1.3.48), receptor type H precursor - human  
Length = 1118

Plus Strand HSPs:

Score = 6029 (2759.6 bits), Expect = 0.0, P = 0.0  
Identities = 1118/1118 (100%), Positives = 1118/1118 (100%), Frame = +3

Query: 42 MAGAGGGLGVWGNLVLGLCSWTGARAPAPNPGRNLTVEPQTSSISLSWEVPDGLDSQN 221  
MAGAGGGLGVWGNLVLGLCSWTGARAPAPNPGRNLTVEPQTSSISLSWEVPDGLDSQN  
Sbjct: 1 MAGAGGGLGVWGNLVLGLCSWTGARAPAPNPGRNLTVEPQTSSISLSWEVPDGLDSQN 60

Query: 222 SNYVQCTGSDGGTTETRNITATNVTVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSVGTVTATAPN 401  
SNYVQCTGSDGGTTETRNITATNVTVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSVGTVTATAPN  
Sbjct: 61 SNYVQCTGSDGGTTETRNITATNVTVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSVGTVTATAPN 120

Query: 402 PVRNLRVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDGLEP 581  
PVRNLRVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDGLEP  
Sbjct: 121 PVRNLRVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDGLEP 180

Query: 582 GCLYAFSMWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRKPESSGGSDHQLHLPELGGPRWHRPTELD 761  
GCLYAFSMWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRKPESSGGSDHQLHLPELGGPRWHRPTELD  
Sbjct: 181 GCLYAFSMWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRKPESSGGSDHQLHLPELGGPRWHRPTELD 240

Query: 762 LLRTSALEMVAEQRLETTQQTPEPVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSWRLVSTTAPN 941  
LLRTSALEMVAEQRLETTQQTPEPVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSWRLVSTTAPN  
Sbjct: 241 LLRTSALEMVAEQRLETTQQTPEPVDGLGPGSLYTCSVWVEKDGVNSSWRLVSTTAPN 300

Query: 942 PVRNLTVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDRLP 1121  
PVRNLTVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDRLP  
Sbjct: 301 PVRNLTVEAQTNSISIALTWEVPDGPDPQNSTYGVVEYTDGGGRAGTRSTAHTNITVDRLP 360

Query: 1122 GCLYVFSVWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRNLMETQNSISIALCWEVPDGPYPQDYT 1301  
GCLYVFSVWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRNLMETQNSISIALCWEVPDGPYPQDYT  
Sbjct: 361 GCLYVFSVWVGKNGINSRETRNATTAHNFVRNLMETQNSISIALCWEVPDGPYPQDYT 420

Query: 1302 YWVGYYTGDGGGTETRNITNTSVTAERLEPGTLYTFSVWAEKNGARGSRQNVISIVPNAV 1481  
YWVGYYTGDGGGTETRNITNTSVTAERLEPGTLYTFSVWAEKNGARGSRQNVISIVPNAV  
Sbjct: 421 YWVGYYTGDGGGTETRNITNTSVTAERLEPGTLYTFSVWAEKNGARGSRQNVISIVPNAV 480

Query: 1482 TSLSKQDWNTSTIALRWTAQPGQSSSYWVSWVRBGMDPRTQSTSGTDITLKELEAG 1661  
TSLSKQDWNTSTIALRWTAQPGQSSSYWVSWVRBGMDPRTQSTSGTDITLKELEAG  
Sbjct: 481 TSLSKQDWNTSTIALRWTAQPGQSSSYWVSWVRBGMDPRTQSTSGTDITLKELEAG 540

Query: 1662 SLVHLTVWAERNEVRGYNSTLTAAAPNEVTDLQNETQTKNSVLMWAKPGDPHSQLYVY 1841  
SLVHLTVWAERNEVRGYNSTLTAAAPNEVTDLQNETQTKNSVLMWAKPGDPHSQLYVY  
Sbjct: 541 SLVHLTVWAERNEVRGYNSTLTAAAPNEVTDLQNETQTKNSVLMWAKPGDPHSQLYVY 600

Query: 1842 VVQWASKGHPRRGQDPQANWVNTSRINETWYKVEALEPGTLYNFTVWAERNVASSTQS 2021  
VVQWASKGHPRRGQDPQANWVNTSRINETWYKVEALEPGTLYNFTVWAERNVASSTQS  
Sbjct: 601 VVQWASKGHPRRGQDPQANWVNTSRINETWYKVEALEPGTLYNFTVWAERNVASSTQS 660

Query: 2022 LCASTYPTVTITTSVSTAGYGVNLIWSCPQGGYEAFALEVGGRGSGDRSSCGEAVSV 2201  
LCASTYPTVTITTSVSTAGYGVNLIWSCPQGGYEAFALEVGGRGSGDRSSCGEAVSV  
Sbjct: 661 LCASTYPTVTITTSVSTAGYGVNLIWSCPQGGYEAFALEVGGRGSGDRSSCGEAVSV 720

FIGURE 5A

WO 03/025199

PCT/US02/29353

Query: 2202 LGLGPARSYPATITTTIWDGKVVSHSVVCHTESAGVIAGAFVGILLFLILVGLLIFFLKR 2381  
 LGLGPARSYPATITTTIWDGKVVSHSVVCHTESAGVIAGAFVGILLFLILVGLLIFFLKR  
 Sbjct: 721 LGLGPARSYPATITTTIWDGKVVSHSVVCHTESAGVIAGAFVGILLFLILVGLLIFFLKR 780

Query: 2382 RNKKKQKKPELRDLVFSSFGDIPARDFADHVRKNERDSENCGFADEYQQLSLVGHSSQSQMV 2561  
 RNKKKQKKPELRDLVFSSFGDIPARDFADHVRKNERDSENCGFADEYQQLSLVGHSSQSQMV  
 Sbjct: 781 RNKKKQKKPELRDLVFSSFGDIPARDFADHVRKNERDSENCGFADEYQQLSLVGHSSQSQMV 840

Query: 2562 ASASENNAKNRYRNVL PYDWSRVPLKPIHEEPGSDYINASFMPGLMSPQEFIA TQGPLPQ 2741  
 ASASENNAKNRYRNVL PYDWSRVPLKPIHEEPGSDYINASFMPGLMSPQEFIA TQGPLPQ  
 Sbjct: 841 ASASENNAKNRYRNVL PYDWSRVPLKPIHEEPGSDYINASFMPGLMSPQEFIA TQGPLPQ 900

Query: 2742 TVGDFWRILVNEQQSHTLVMLTNCMEAGRVKCEHYWPLDSQPCTHGHRLVTLVGEVVMENW 2921  
 TVGDFWRILVNEQQSHTLVMLTNCMEAGRVKCEHYWPLDSQPCTHGHRLVTLVGEVVMENW  
 Sbjct: 901 TVGDFWRILVNEQQSHTLVMLTNCMEAGRVKCEHYWPLDSQPCTHGHRLVTLVGEVVMENW 960

Query: 2922 TVRELLLLQVEBQKTL SVRQPHYQAWPDHGVPSPTLLAFWRMLRQWLDQTMEGGPPIV 3101  
 TVRELLLLQVEBQKTL SVRQPHYQAWPDHGVPSPTLLAFWRMLRQWLDQTMEGGPPIV  
 Sbjct: 961 TVRELLLLQVEBQKTL SVRQPHYQAWPDHGVPSPTLLAFWRMLRQWLDQTMEGGPPIV 1020

Query: 3102 HCSAGVGRGTGLIALDVLLRQLQSEGILGPFSPVRKMRRESRPLMVQTEAQVFLHQICG 3281  
 HCSAGVGRGTGLIALDVLLRQLQSEGILGPFSPVRKMRRESRPLMVQTEAQVFLHQICG  
 Sbjct: 1021 HCSAGVGRGTGLIALDVLLRQLQSEGILGPFSPVRKMRRESRPLMVQTEAQVFLHQICG 1080

Query: 3282 SSNSQPRPQPRRKSRMRMSKTSSTRTWPPSRPTSWRSK 3395  
 SSNSQPRPQPRRKSRMRMSKTSSTRTWPPSRPTSWRSK  
 Sbjct: 1081 SSNSQPRPQPRRKSRMRMSKTSSTRTWPPSRPTSWRSK 1118

FIGURE 5B

## 【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  
27 March 2003 (27.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/025199 A3**

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, 1/42, G01N 33/53
- (21) International Application Number: PCT/US02/29353
- (22) International Filing Date: 17 September 2002 (17.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/323,018 18 September 2001 (18.09.2001) 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): LOGAN, Thomas, Joseph [US/US]; 651 Old School House Dr., Springfield, PA 19064 (US).
- (74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AU, 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, MY, 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.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BL, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EL, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 30 October 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/025199 A3

(54) Title: MID 4460, A HUMAN TYROSINE PHOSPHATASE FAMILY MEMBER AND USES THEREFOR

(57) Abstract: The invention provides isolated nucleic acid molecules, designated MID 4460 nucleic acid molecules, which encode novel tyrosine phosphatase family members. The invention also provides antisense nucleic acid molecules, recombinant expression vectors containing MID 4460 nucleic acid molecules, host cells into which the expression vectors have been introduced, and non-human transgenic animals in which a MID 4460 gene has been introduced or disrupted. The invention still further provides isolated MID 4460 proteins, fusion proteins, antigenic peptides and anti-MID 4460 antibodies. Diagnostic and therapeutic methods utilizing compositions of the invention are also provided.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/29353
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C12Q 1/68, 1/42; G01N 33/53 US CL : 435/6, 7.1, 21 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, 21, 195, 196; 536/23.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATOUZAKI et al. Molecular Cloning of Human Transmembrane-Type Protein Tyrosine Phosphatases and Its Expression in Gastrointestinal Cancer. J. Biol. Chem. 21 January 1994, Vol. 269, pages 2075-2081, see the abstract and Figure 1.	1-9
X,P	WO 01/94629 A2 (AVALON PHARMACEUTICALS) 13 December 2001, see the entire document and SEQ ID NO: 88.	1-9
Y	Data Base EST, Accession No. AA573849, NCI-CGAP, 12 September 1997.	1 and 3
Y	Data Base EST, Accession No. BE304621, NIH-MGC, 13 July 2000.	1 and 3
Y	Data Base GenBank, Accession No. G13498, Myers, R. M. "Human STS SHGC-1029237, sequence tagged site", 04 January 1996.	1 and 3
A	EP 1022401 A2 (GBNSET) 06 September 2000, see entire document.	1-9
A	US 5,821,075 A (GONEZ et al.) 13 October 1998, the entire document.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims (4) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2003 (18.06.2003)		Date of mailing of the international search report 16 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Nashat T. Nashat Telephone No. 703-308-0196

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/JP802/29353

**Confirmation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
WEST: USPT, PGPB, JPAB, EPAB, and DWHI; STN: Medline, CaPlus, Scisearch, Lifesci, Biosis, and Embase.  
Sequence search in commercial data bases, published U. S. application file and issued patent files of SEQ ID NO's: 1-4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/29353
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.		

## フロントページの続き

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

F I

テーマコード(参考)

4 C 0 8 6

A 6 1 K 48/00  
 A 6 1 P 1/00  
 A 6 1 P 1/02  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 1/12  
 A 6 1 P 1/14  
 A 6 1 P 1/16  
 A 6 1 P 3/04  
 A 6 1 P 3/06  
 A 6 1 P 3/08  
 A 6 1 P 3/10  
 A 6 1 P 5/14  
 A 6 1 P 5/16  
 A 6 1 P 7/00  
 A 6 1 P 7/04  
 A 6 1 P 7/06  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 9/04  
 A 6 1 P 9/06  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 9/12  
 A 6 1 P 9/14  
 A 6 1 P 11/00  
 A 6 1 P 11/06  
 A 6 1 P 13/12  
 A 6 1 P 15/00  
 A 6 1 P 17/00  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 19/00  
 A 6 1 P 19/02  
 A 6 1 P 19/04  
 A 6 1 P 19/10  
 A 6 1 P 21/04  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 P 25/04  
 A 6 1 P 25/06  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 P 27/16  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 29/02  
 A 6 1 P 31/04  
 A 6 1 P 31/12  
 A 6 1 P 31/14  
 A 6 1 P 31/20  
 A 6 1 P 31/22  
 A 6 1 P 33/00  
 A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 1/00  
 A 6 1 P 1/02  
 A 6 1 P 1/04  
 A 6 1 P 1/12  
 A 6 1 P 1/14  
 A 6 1 P 1/16  
 A 6 1 P 3/04  
 A 6 1 P 3/06  
 A 6 1 P 3/08  
 A 6 1 P 3/10  
 A 6 1 P 5/14  
 A 6 1 P 5/16  
 A 6 1 P 7/00  
 A 6 1 P 7/04  
 A 6 1 P 7/06  
 A 6 1 P 9/00  
 A 6 1 P 9/04  
 A 6 1 P 9/06  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 9/10  
 A 6 1 P 9/12  
 A 6 1 P 9/14  
 A 6 1 P 11/00  
 A 6 1 P 11/06  
 A 6 1 P 13/12  
 A 6 1 P 15/00  
 A 6 1 P 17/00  
 A 6 1 P 17/06  
 A 6 1 P 19/00  
 A 6 1 P 19/02  
 A 6 1 P 19/04  
 A 6 1 P 19/10  
 A 6 1 P 21/04  
 A 6 1 P 25/00  
 A 6 1 P 25/04  
 A 6 1 P 25/06  
 A 6 1 P 27/02  
 A 6 1 P 27/16  
 A 6 1 P 29/00  
 A 6 1 P 29/02  
 A 6 1 P 29/04  
 A 6 1 P 29/10  
 A 6 1 P 31/04  
 A 6 1 P 31/12  
 A 6 1 P 31/14  
 A 6 1 P 31/20  
 A 6 1 P 31/22

1 0 1

1 0 3

1 0 1



A 6 1 P	35/02	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	35/04	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/00	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/02	A 6 1 P	35/04	
A 6 1 P	37/06	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	37/08	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00	A 6 1 P	37/06	
C 1 2 N	15/09	A 6 1 P	37/08	
G 0 1 N	33/15	A 6 1 P	43/00	1 0 5
G 0 1 N	33/50	A 6 1 P	43/00	1 1 1
G 0 1 N	33/53	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/566	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/53	M
		G 0 1 N	33/566	
		C 1 2 N	15/00	A
		A 6 1 K	37/02	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ポケットベル

(72)発明者 ローガン, トーマス ジョセフ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア 1 9 0 6 4 , スプリングフィールド, オールド スクール  
ハウス ドライブ 6 5 1

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 BA11 CA04 CA12 HA08 HA12  
4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ34 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR42  
QR50 QR62 QR66 QR72 QR77 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01  
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 MA13 MA16 MA23 MA31 MA35 MA37  
MA52 MA55 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA022 ZA082  
ZA332 ZA342 ZA362 ZA382 ZA402 ZA422 ZA442 ZA452 ZA532 ZA552  
ZA592 ZA662 ZA672 ZA682 ZA692 ZA702 ZA732 ZA752 ZA812 ZA892  
ZA942 ZA962 ZA972 ZB052 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB262  
ZB272 ZB332 ZB352 ZB382 ZC062 ZC202 ZC212 ZC332 ZC352 ZC542  
4C085 AA14 AA16 BB11 CC23 EE01 GG01 GG08 GG10  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA08 ZA33 ZA34  
ZA36 ZA38 ZA40 ZA42 ZA44 ZA45 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66  
ZA67 ZA68 ZA69 ZA70 ZA73 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZA96  
ZA97 ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33  
ZB35 ZB38 ZC06 ZC20 ZC21 ZC33 ZC35 ZC54