

(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2005-507669

(P2005-507669A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 E	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 176 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-540378 (P2003-540378)	(71) 出願人	500287639
(86) (22) 出願日	平成14年10月29日 (2002.10.29)		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2月19日 (2004.2.19)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034730		MILLENNIUM PHARMACE
(87) 国際公開番号	W02003/038113		UTICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成15年5月8日 (2003.5.8)		アメリカ合衆国02139マサチューセッ
(31) 優先権主張番号	60/335,004		ツ州ケンブリッジ、ランズタウン・ストリ
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		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】 25943を用いる細胞増殖障害の処置および診断のための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、乳癌、卵巣癌、肺癌、および結腸癌を含むがこれらに限定されない、細胞増殖障害の処置および診断のための方法および組成物に関する。本発明はさらに、細胞増殖障害を処置し得るかまたは細胞増殖を調節し得る、化合物を同定するための方法を提供する。本発明はまた、例えば、被験体における細胞増殖を調節するための細胞増殖を調節するための方法を提供する。さらに、本発明は、異常な25943ポリペプチド活性または異常な25943核酸発現によって特徴付けられる細胞増殖障害を有する被験体を処置するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞増殖障害を処置し得る化合物を同定するための方法であって、該化合物が 25943 核酸発現または 25943 ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイし、それによって、細胞増殖障害を処置し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

細胞増殖を調節し得る化合物を同定するための方法であって、以下：

- a) 25943 を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；および
- b) 該試験化合物が、25943 核酸の発現または 25943 ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイし、それによって、細胞増殖を調節し得る化合物を同定する工程を包含する、方法。

【請求項 3】

細胞中の細胞増殖を調節するための方法であって、細胞を 25943 モジュレーターと接触させ、それによって、該細胞中の細胞増殖を調節する工程を包含する、方法。

【請求項 4】

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

【請求項 5】

前記 25943 モジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 25943 モジュレーターが、25943 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 25943 モジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 25943 モジュレーターが、25943 核酸発現を調節し得る、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

異常な 25943 ポリペプチド活性または異常な 25943 核酸発現によって特徴付けられる細胞増殖障害を有する被験体を処置するための方法であって、25943 モジュレーターを該被験体に投与し、それによって、該細胞増殖障害を有する被験体を処置する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

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

【請求項 11】

前記 25943 モジュレーターが、薬学的に受容可能な処方物中で投与される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 25943 モジュレーターが、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 25943 モジュレーターが、25943 ポリペプチド活性を調節し得る、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

本出願は、米国特許仮出願番号 60/335,004 (2001 年 10 月 31 日出願) (50

その内容の全体が本明細書中で参考として援用される) に対する優先権を主張する。

【0002】

結腸直腸癌は、世界で4番目に多い癌であり、そして癌による死の2番目に多い原因である。米国内のみでも、今年、150,000人を超える新症例、および55,000を超える死亡例がある。実際に、西部の人口の50%が、70歳までに結腸直腸腫瘍を発症し、これらの腫瘍の10%が悪性に進行する。治療的処置の発達にもかかわらず、予後は悪いままであり、5年間の生存率は、わずか、約45%である。この疾患の進行は、十分に特徴付けられているが(結腸内の形成異常の領域は、ポリープへと発達し、これは、最終的に、腺癌となる可能性を有し;腺癌は、浸潤性となり、そして種々の身体の領域(主に肝臓)へ転移する)、診断は、主に、疾患の後期の間になされる。

10

【0003】

卵巣癌(最も死亡率の高い婦人科の癌)は、米国の女性の癌による死の5番目の主な原因であり;およそ13,900人の米国女性が、2001年に卵巣癌で死亡している。卵巣癌は、女性の55人の内1人が発症し、そしてこの疾患と診断される女性の数は、2000年の23,100の新しい症例から、2001年には予想として23,400の症例へと、わずかに増加することが見積もられている。現在、卵巣癌と診断された女性の50%が、5年以内に死亡している。早期に発見された場合、卵巣癌は、非常に治療しやすいが、大部分の場合、癌が卵巣を超えて広がるまで診断されない。例えば、卵巣癌が、卵巣を超えて広がる前に検出される場合、90%を超える女性は、5年よりも長く生存する。しかし、米国における卵巣癌の症例のわずか25%しか、初期に診断されず;進行した状態で診断された場合、5年の生存の機会は、わずかに約25%である。卵巣癌は、診断することが困難であり得る。なぜならば、症状が他の疾患と容易に混同され、そして信頼のおける簡便な投与スクリーニングツール(reliable, easy-to-administer screening tool)が存在しないからである。

20

【0004】

肺癌は、西欧諸国において最も多い癌である。米国において、1999年に約170,000の肺癌の新しい症例があった。1990年の半ばから、約150,000人の米国人が、この疾患で毎年死亡している。肺癌は、男性の癌による死亡の主なカテゴリーであり、そして(1980年以降)肺癌は、女性の癌による死亡の主なカテゴリーとしての乳癌を超えている。米国国立癌研究所(NCI)の調査結果は、癌に関係する死亡の上昇傾向は、肺癌の死亡率の急速な増加に起因していることを示す。統計学的予想は、この10年間の肺癌による死亡率が、米国において100,000人の集団あたり毎年50人を超える死亡の割合で上昇し続けていることを示唆する。現在の肺癌予防プログラムは、2000年を過ぎるまで、肺癌による死亡率に影響するとは予想されない。米国における肺癌の症例の数と肺癌による死亡の数の間には密接な関係がある。このことは、この疾患に関する低い5年間の生存率に起因する。肺癌の生存率は、過去40年間にわたって改善されているが、パーセンテージ(約13%)は、他の癌と比較して低いままである。

30

【0005】

これらの疾患の罹患率、および有効な治療および早期診断の欠如により、現在、症状の発症の前に、マーカーとして機能し得、そしてこれらの障害を処置および/または治療するための治療剤を同定するための手段として働き得る、方法および組成物についての多大な必要性が存在する。

40

【0006】

本発明は、細胞増殖障害の診断および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、25943遺伝子(グリコシルアスパラキナーゼ)の発現が、腫瘍(例えば、卵巣腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、および結腸腫瘍)においてアップレギュレートされるという発見に一部基づく。本発明は、さらに、25943発現が、細胞周期の間に調節されるという発見に少なくとも一部基づく。本発明は、なおさらに、25943が、タンパク質の翻訳後の改変およびプロセッシングに関与し得るという発見に少なくとも一部基づく。機構により制限されることは意図しないが、25943活性の調節は、腫瘍細胞におけるタンパク

50

質調節（例えば、翻訳後の改変およびプロセス）（それらの腫瘍形成能力に関連する）を調節し、それによって、例えば、細胞性増殖および腫瘍形成の阻害を調節することが考えられる。

【0007】

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

【0008】

1つの局面では、本発明は、細胞増殖障害（例えば、乳癌、卵巣癌、肺癌、および結腸癌）を処置し得る化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、化合物の、25943核酸発現または25943ポリペプチド活性を調節する能力をアッセイする工程を包含する。1つの実施形態では、化合物の、核酸発現または25943ポリペプチド活性を調節する能力は、細胞のグリコシルアスパラギナーゼ活性を検出することにより、決定される。別の実施形態では、化合物の、核酸発現または25943ポリペプチド活性を調節する能力は、細胞における細胞増殖の調節を検出することにより、決定される。

【0009】

別の局面では、本発明は、細胞増殖を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。この方法は、25943核酸またはポリペプチドを発現する細胞（例えば、乳房細胞、乳房腫瘍細胞、卵巣細胞、卵巣腫瘍細胞、肺細胞、肺腫瘍細胞、結腸細胞、および／または結腸腫瘍細胞）を、試験化合物と接触させる工程、および試験化合物の、25943核酸の発現または25943ポリペプチドの活性を調節する能力をアッセイする工程を包含する。

【0010】

さらなる局面では、本発明は、細胞増殖を調節するための方法を特徴とする。この方法は、ある細胞（例えば、乳房細胞、乳房腫瘍細胞、卵巣細胞、卵巣腫瘍細胞、肺細胞、肺腫瘍細胞、結腸細胞、および／または結腸腫瘍細胞）を、25943モジュレーター（例えば、抗25943抗体、配列番号2のアミノ酸配列を含む25943ポリペプチド、またはそのフラグメント、配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む25943ポリペプチド、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、低分子、アンチセンス25943核酸分子、配列番号1の核酸分子、またはそのフラグメント、あるいはリボザイム）と接触させる工程を包含する。

【0011】

さらに別の局面では、本発明は、細胞増殖障害（例えば、異常な29543ポリペプチド活性または異常な25943核酸発現により特徴付けられる細胞増殖障害（例えば、乳癌、卵巣癌、肺癌、および結腸癌））を有する被験体を処置するための方法を特徴とする。この方法は、治療的有効量の25943モジュレーターを、例えば、薬学的に受容可能な処方物中で、または遺伝子治療ベクターを用いて、被験体に投与する工程を包含する。1つの実施形態では、25943モジュレーターは、低分子、抗25943抗体、配列番号2のアミノ酸配列を含む25943ポリペプチドまたはそのフラグメント、配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む25943ポリペプチド、配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチドの単離された天然に存在する対立遺伝子改変体、アンチセンス25943核酸分子、配列番号1の核酸分子またはそのフラグメント、あるいはリボザイムであり得る。

【0012】

別の局面では、本発明は、25943モジュレーターを被験体に投与することにより、被験体において細胞増殖を調節する（例えば、増加または減少させる）ための方法を提供する。

【0013】

別の実施形態では、本発明は、配列番号1または3に示されるヌクレオチド配列（例えば、ヌクレオチド配列の全長）、あるいはそれらの相補体に対して、少なくとも、81%、

82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上同一である25943核酸分子を提供する。

【0014】

好ましい実施形態では、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、あるいはそれらの相補体を含む。別の好ましい実施形態では、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からなる。別の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号1または3のヌクレオチド配列、あるいはそれらの相補体の、少なくとも、1045、1046、1047、1050、1075、1100、1200、1300、1350以上のヌクレオチドのフラグメント（例えば、連続するヌクレオチド）を含む。 10

【0015】

別の実施形態では、25943核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列と十分に同一な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含む。好ましい実施形態では、25943核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列の完全配列に対して、少なくとも、76%、77%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上同一であ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含む。

【0016】

別の好ましい実施形態では、単離された核酸分子は、ヒト25943のアミノ酸配列をコードする。さらに別の好ましい実施形態では、この核酸分子は、配列番号2の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含む。 20

【0017】

他の好ましい実施形態では、核酸分子は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドの天然に存在する対立遺伝子改変体をコードし、ここで、この核酸分子は、ストリンジェントな条件下で、配列番号1または3を含む核酸分子の相補体にハイブリダイズする。

【0018】

本発明の別の局面は、単離されたまたは組換えの25943タンパク質および25943ポリペプチドを特徴とする。好ましい実施形態では、25943タンパク質ファミリーメンバーは、配列番号2のアミノ酸配列に対して、少なくとも約76%、77%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上同一であるアミノ酸配列を有する。 30

【0019】

さらに別の好ましい実施形態では、25943タンパク質ファミリーメンバーは、配列番号1または3のヌクレオチド配列を含む核酸分子の相補体に対して、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するタンパク質のフラグメントを特徴とし、ここで、このフラグメントは、配列番号2のアミノ酸の、少なくとも、232、233、234、250、275、または300のアミノ酸（例えば、連続するアミノ酸）を含む。別の実施形態では、タンパク質（好ましくは、25943タンパク質）は、配列番号2のアミノ酸配列を有する。 40

【0021】

別の実施形態では、本発明は、配列番号1または3のヌクレオチド配列、あるいはそれらの相補体に対して、少なくとも、約81%、82%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上同一であるヌクレオチド配列からなる核酸分子によりコードされる、単離された25943タンパク質ファミリーメンバーを特徴とする。本発明は、さら 50

に、配列番号1または3のヌクレオチド配列の相補体を含む核酸分子に対して、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列からなる核酸分子によりコードされる、単離されたタンパク質（好ましくは、25943タンパク質）を特徴とする。

【0022】

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

【0023】

表1は、Taqman分析により決定される、種々のヒト細胞型および組織におけるヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1) 正常な動脈；(2) 罹病大動脈；(3) 正常な静脈；(4) 冠状動脈平滑筋細胞；(5) ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）；(6) 正常な心臓；(7) 心臓（うっ血性心不全）；(8) 腎臓；(9) 骨格筋；(10) 正常な脂肪細胞；(11) 膵臓；(12) 初代骨芽細胞；(13) 分化した骨芽細胞；(14) 正常な皮膚；(15) 正常な脊髄；(16) 正常な脳皮質；(17) 正常な脳視床下部；(18) 神経；(19) 脊髄神経節；(20) 正常な乳房；(21) 乳房腫瘍；(22) 正常な卵巣；(23) 卵巣腫瘍；(24) 正常な前立腺；(25) 前立腺腫瘍；(26) 唾液腺；(27) 正常な結腸；(28) 結腸腫瘍；(29) 肺腫瘍；(30) 肺（慢性閉塞性肺疾患）；(31) 結腸（炎症性腸疾患）；(32) 正常な肝臓；(33) 肝臓線維症；(34) 正常な脾臓；(35) 正常な扁桃；(36) 正常なリンパ節；(37) 正常な小腸；(38) マクロファージ；(39) 滑膜；(40) 活性化末梢血単核細胞；(41) 好中球；(42) 巨核球；(43) 赤血球系細胞；(44) ポジティブコントロール。

【0024】

表2は、Taqman分析により決定される、種々のヒト腫瘍におけるヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1-3) 正常な乳房；(4) 乳房腫瘍（MD-IDC）；(5) 乳房腫瘍；(6) 乳房腫瘍（PD-）；(7) 乳房腫瘍（IDC）；(8) 乳房腫瘍（ILC（LG））；(9) リンパ；(10) 肺（乳房転移）；(11-12) 正常な卵巣；(13-17) 卵巣腫瘍；(18-20) 正常な肺；(21) 肺腫瘍（SmC）；(22-23) 肺腫瘍（PDNSCC）；(24) 肺腫瘍（SCC）；(25-26) 肺腫瘍（ACA）；(27-29) 正常な結腸；(30-31) 結腸腫瘍（MD）；(32) 結腸腫瘍；(33) 結腸腫瘍（MD-PD）；(34-35) 結腸腫瘍-肝臓転移；(36) 正常な肝臓（女性）；(37-38) 頸部-扁平上皮癌；(39) ヒト微小血管内皮細胞（HMVEC）-停止；(40) ヒト微小血管内皮細胞（HMVEC）-増殖；(41) 血管腫；(42) HCT116細胞-酸素正常状態；(43) HCT116細胞-低酸素性。

【0025】

表3は、Taqman分析により決定される、種々の異種移植片（腫瘍形成性）細胞株におけるヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1) MCF-7乳房腫瘍；(2) ZR75乳房腫瘍；(3) T47D乳房腫瘍；(4) MDA 231乳房腫瘍；(5) MDA 435乳房腫瘍；(6) SKBr3乳房腫瘍；(7) DLD 1結腸腫瘍（ステージC）；(8) SW480結腸腫瘍（ステージB）；(9) SW620結腸腫瘍（ステージC）；(10) HCT 116結腸腫瘍；(11) HT29結腸腫瘍；(12) colo 205結腸腫瘍；(13) NCIH125肺腫瘍；(14) NCIH67肺腫瘍；(15) NCIH322肺腫瘍；(16) NCIH460肺腫瘍；(17) A549肺腫瘍；(18) 正常なヒト気管支上皮（NHBE）；(19) SKOV-3卵巣腫瘍；(20) OVCAR-3卵巣腫瘍；(21) 293乳児腎臓細胞；(22) 293T乳児腎臓細胞。

【0026】

表4は、Taqman分析により決定される、種々の異種移植片（腫瘍形成性）細胞株におけるヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1) MCF-7乳

房腫瘍；(2) Z R 7 5 乳房腫瘍；(3) T 4 7 D 乳房腫瘍；(4) M D A 2 3 1 乳房腫瘍；(5) M D A 4 3 5 乳房腫瘍；(6) S K B r 3 乳房腫瘍；(7) D L D 1 結腸腫瘍（ステージC）；(8) S W 4 8 0 結腸腫瘍（ステージB）；(9) S W 6 2 0 結腸腫瘍（ステージC）；(10) H C T 1 1 6 結腸腫瘍；(11) H T 2 9 結腸腫瘍；(12) c o l o 2 0 5 結腸腫瘍；(13) N C I H 1 2 5 結腸腫瘍；(14) N C I H 6 7 結腸腫瘍；(15) N C I H 3 2 2 結腸腫瘍；(16) N C I H 4 6 0 結腸腫瘍；(17) A 5 4 9 結腸腫瘍；(18) 正常なヒト気管支上皮（N H B E）；(19) S K O V - 3 卵巣腫瘍；(20) O V C A R - 3 卵巣腫瘍；(21) 2 9 3 乳児腎臓細胞；(22) 2 9 3 T 乳児腎臓細胞。

【0027】

10

表5は、T a q m a n 分析により決定される、種々のステージの結腸腫瘍におけるヒト 2 5 9 4 3 m R N A の発現レベルを示す。サンプル番号：(1-5) 正常な結腸；(6-7) 腺腫；(8-12) 結腸 A C A - B ；(13-18) 結腸 A C A - C ；(19-24) 正常な肝臓；(25-30) 肝臓転移。

【0028】

表6は、T a q m a n 分析により決定される、種々のステージの結腸腫瘍におけるヒト 2 5 9 4 3 m R N A の発現レベルを示す。サンプル番号：(1-5) 正常な結腸；(6-7) 腺腫；(8-12) 結腸 A C A - B ；(13-18) 結腸 A C A - C ；(19-24) 正常な肝臓；(25-30) 肝臓転移。

【0029】

20

表7は、T a q m a n 分析により決定される、種々の結腸転移におけるヒト 2 5 9 4 3 m R N A の発現レベルを示す。サンプル番号：(1-3) 正常な結腸；(4-5) 結腸 A C A - C ；(6) 結腸 A C A - B ；(7) 腺癌；(8-24) 肝臓への結腸転移；(25-27) 正常な肝臓。

【0030】

表8は、T a q m a n 分析により決定される、k - r a s 破壊 D L D - 1 および H C T 1 1 6 結腸腫瘍細胞におけるヒト 2 5 9 4 3 m R N A の発現レベルを示す。サンプル番号：(1-4) D L D - 1 ；(5-9) H C T - 1 1 6 細胞。

【0031】

表9は、T a q m a n 分析により決定される、細胞周期を通して進行するように誘導された、同調した腫瘍細胞における、ヒト 2 5 9 4 3 m R N A の発現レベルを示す。サンプル番号：(1) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 0 ；(2) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 3 ；(3) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 6 ；(4) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 9 ；(5) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 1 2 ；(6) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 1 5 ；(7) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 1 8 ；(8) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 2 1 ；(9) H C T 1 1 6、アフィジコリン、t = 2 4 ；(10) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 0 ；(11) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 3 ；(12) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 6 ；(13) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 9 ；(14) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 1 5 ；(15) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 1 8 ；(16) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 2 1 ；(17) H C T 1 1 6、ノコダゾール、t = 2 4 ；(18) D L D、ノコダゾール、t = 3 ；(19) D L D、ノコダゾール、t = 6 ；(20) D L D、ノコダゾール、t = 9 ；(21) D L D、ノコダゾール、t = 1 2 ；(22) D L D、ノコダゾール、t = 1 5 ；(23) D L D、ノコダゾール、t = 1 8 ；(24) D L D、ノコダゾール、t = 2 1 ；(25) A 5 4 9、m i m o、t = 0 ；(26) A 5 4 9、m i m o、t = 3 ；(27) A 5 4 9、m i m o、t = 6 ；(28) A 5 4 9、m i m o、t = 9 ；(29) A 5 4 9、m i m o、t = 1 5 ；(30) A 5 4 9、m i m o、t = 1 8 ；(31) A 5 4 9、m i m o、t = 2 1 ；(32) A 5 4 9、m i m o、t = 2 4 ；(33) M C F 1 0 A、m i m o、t = 0 ；(34) M C F 1 0 A、m i m o、t = 3 ；(35) M C F 1 0 A、m i m o、t = 6 ；(36) M C F 1 0 A、m i m o、t = 9 ；(37) M C F 1 0

30

40

50

A、m i m o、t = 1 2 ; (3 8) M C F 1 0 A、m i m o、t = 1 8 ; (3 9) M C F 1 0 A、m i m o、t = 2 1 ; (4 0) M C F 1 0 A、m i m o、t = 2 4。

【0032】

表10は、Taqman分析により決定される、種々のインビトロでの癌遺伝子細胞モデルにおける、ヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1) SMAD4-SW480コントロール；(2) SMAD4-SW480 24時間；(3) SMAD4-SW480 48時間；(4) SMAD4-SW480 72時間；(5) L51747μチン；(6) HT29非μチン；(7) SW620非μチン；(8) CSC-1正常；(9) NCM-260正常；(10) HCT116 RER+；(11) SW48 RER+；(12) SW480 RER-/-；(13) CACO RER-/-；(14) JDL D-1；(15) JHCT116；(16) DKO1；(17) DKO4；(18) DKS-8；(19) Hke3；(20) HKh2；(21) HK2-6；(22) e3Ham#9；(23) APC5-/-；(24) APC6-/-；(25) APC1+/+；(26) APC13+/+。

【0033】

表11は、Taqman分析により決定される、種々の卵巣細胞腫瘍モデルにおける、ヒト25943mRNAの発現レベルを示す。サンプル番号：(1) SKOV-3, 非成長(増殖)因子；(2) SKOV-3, EGF 15'；(3) SKOV-3, EGF 30'；(4) SKOV-3, EGF 60'；(5) SKOV-3, Hrg 15'；(6) SKOV-3, Hrg 30'；(7) SKOV-3, Hrg 60'；(8) SKOV-3 var, 非成長(増殖)因子；(9) SKOV-3 var, 血清30'；(10) SKOV-3 var, EGF 15'；(11) SKOV-3 var, EGF 30'；(12) SKOV-3 var, EGF 60'；(13) SKOV-3 var, Hrg 15'；(14) SKOV-3 var, Hrg 30'；(15) SKOV-3 var, Hrg 60'；(16) HEY形成性；(17) HEY軟寒天；(18) SKOV-3；(19) SKOV-3 var；(20) A2780；(21) A2780-ADR；(22) OVCAR-3；(23) OVCAR-4；(24) MDA2774；(25) DOV13；(26) Caov-3；(27) ES-2；(28) HEY 0時間；(29) HEY 1時間；(30) HEY 3時間；(31) HEY 6時間；(32) HEY 9時間；(33) HEY 12時間；(34) SKOV-3 形成性；(35) SKOV-3 SubQ腫瘍；(36) SKOV-3 改変体、形成性；(37) SKOV-3 var, SubQ腫瘍；(38) 正常な卵巣；(39) 正常な卵巣；(40) 卵巣腹水；(41) 卵巣腹水。

【0034】

【表1】

表 1:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	動脈正常	8.4607
2	大動脈罹病	10.4164
3	静脈正常	1.7542
4	冠状動脈 SMC	0
5	HUVEC	341.5101
6	心臓正常	35.1581
7	心臓 CHF	12.2591
8	腎臓	197.5103
9	骨格筋	24.6034
10	脂肪正常	4.6293
11	脾臓	58.924
12	初代骨芽細胞	0.269
13	骨芽細胞(diff)	1.8035
14	皮膚正常	282.2411
15	脊髓正常	116.6291
16	脳皮質正常	2313.3764
17	脳視床下部正常	1500.039
18	神経	110.7209
19	DRG(脊髓神経節)	119.908
20	乳房正常	9.7526
21	乳房腫瘍	6.7776
22	卵巣正常	26.278
23	卵巣腫瘍	347.4796
24	前立腺正常	147.6241
25	前立腺腫瘍	144.0858
26	唾液腺	10.0965
27	結腸正常	11.5577
28	結腸腫瘍	62.5
29	肺腫瘍	198.196
30	肺 COPD	22.2508
31	結腸 IBD	58.517
32	肝臓 正常	30.9268
33	肝臓線維症	8.5196
34	脾臓正常	1.3668
35	扁桃正常	3.6195
36	リンパ節正常	4.1433
37	小腸正常	7.1146
38	マクロファージ	1.3907
39	滑膜	0.7478
40	活性化 PBMC	0.9698
41	好中球	43.1349
42	巨核球	65.3803
43	赤血球	181.1178
44	ポジティブコントロール	1337.9276

10

20

30

40

【 0 0 3 5 】

【 表 2 】

表 2:

サンプル番号	組織型	相対的発現
1	PIT 400 乳房 N	3.17
2	PIT 372 乳房 N	3.40
3	CHT 1228 乳房正常	0.84
4	MDA 304 乳房 T: MD-IDC	0.55
5	CHT 2002 乳房 T: IDC	2.22
6	MDA 236-乳房 T:PD-IDC(ILC?)	0.17
7	CHT 562 乳房 T: IDC	0.52
8	NDR 138 乳房 T ILC(LG)	0.36
9	CHT 1841 リンパ節(乳房 met)	0.00
10	PIT 58 肺(乳房 met)	13.28
11	CHT 620 卵巣 N	0.37
12	PIT 208 卵巣 N	10.34
13	CLN 012 卵巣 T	141.61
14	CLN 07 卵巣 T	216.13
15	CLN 17 卵巣 T	248.27
16	MDA 25 卵巣 T	458.50
17	CLN 08 卵巣 T	104.39
18	MDA 185 肺 N	7.14
19	PIT 298 肺 N	4.52
20	CLN 930 肺 N	8.82
21	MPI 215 肺 T--SmC	95.06
22	MDA 259 肺 T-PDNSCCL	88.08
23	CHT 832 肺 T-PDNSCCL	10.17
24	MDA 262 肺 T-SCC	18.58
25	CHT 793 肺 T-ACA	10.06
26	CHT 331 肺 T-ACA	15.68
27	CHT 405 結腸 N	3.64
28	CHT 523 結腸 N	3.42
29	CHT 371 結腸 N	1.10
30	CHT 382 結腸 T: MD	24.77
31	CHT 528 結腸 T: MD	30.40
32	CLN 609 結腸 T	1.41
33	NDR 210 結腸 T: MD-PD	13.51
34	CHT 340 結腸-肝臓 Met	4.98
35	CHT 1637 結腸-肝臓 Met	0.74
36	PIT 260 肝臓 N(女性)	1.75
37	CHT 1653 頸部 扁平上皮 CC	6.41
38	CHT 569 頸部 扁平上皮 CC	0.25
39	A24HMVEC-Arr	2.71
40	C48HMVEC-Prol	2.85
41	プールされた血管腫	0.12
42	HCT116N22 酸素正常状態	36.27
43	HCT116H22 低酸素性	20.05

10

20

30

40

【 0 0 3 6 】

【 表 3 】

表 3:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	MCF-7 乳房 T	25.56
2	ZR75 乳房 T	14.48
3	T47D 乳房 T	11.40
4	MDA 231 乳房 T	2.36
5	MDA 435 乳房 T	2.65
6	SKBr3 乳房	10.86
7	DLD 1 結腸 T(ステージ C)	57.31
8	SW480 結腸 T(ステージ B)	2.88
9	SW620 結腸 T(ステージ C)	13.23
10	HCT116	5.58
11	HT29	0.64
12	Colo 205	0.46
13	NCIH125	9.52
14	NCIH67	6.32
15	NCIH322	18.58
16	NCIH460	3.92
17	A549	10.10
18	NHBE	19.85
19	SKOV-3 卵巣	4.06
20	OVCAR-3 卵巣	11.84
21	293 乳児腎臓	27.30
22	293T 乳児腎臓	44.66

10

20

【 0 0 3 7 】

【 表 4 】

表 4:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	MCF-7 乳房 T	20.83
2	ZR75 乳房 T	6.15
3	T47D 乳房 T	8.97
4	MDA 231 乳房 T	0.29
5	MDA 435 乳房 T	0.54
6	SKBr3 乳房	20.40
7	DLD 1 結腸 T(ステージ C)	9.82
8	SW480 結腸 T(ステージ B)	6.92
9	SW620 結腸 T(ステージ C)	41.67
10	HCT116	26.01
11	HT29	3.04
12	Colo 205	1.44
13	NCIH125	12.05
14	NCIH67	458.50
15	NCIH322	6.11
16	NCIH460	3.27
17	A549	26.46
18	NHBE	0.00
19	SKOV-3 卵巣	191.44
20	OVCAR-3 卵巣	39.97
21	293 乳児腎臓	150.73
22	293T 乳児腎臓	172.54

10

20

【 0 0 3 8 】

【 表 5 】

表 5:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	CHT 410 結腸 N	1.59
2	CHT 425 結腸 N	1.68
3	CHT 371 結腸 N	0.16
4	PIT 281 結腸 N	1.53
5	NDR 211 結腸 N	0.40
6	CHT 122 脾腫	3.33
7	CHT 887 脾腫	10.20
8	CHT 414 結腸 ACA-B	2.13
9	CHT 841 結腸 ACA-B	0.39
10	CHT 890 結腸 ACA-B	1.67
11	CHT 910 結腸 ACA-B	6.78
12	CHT 377 結腸 ACA-B	0.48
13	CHT 520 結腸 ACA-C	1.89
14	CHT 596 結腸 ACA-C	2.09
15	CHT 907 結腸 ACA-C	5.08
16	CHT 372 結腸 ACA-C	7.57
17	NDR 210 結腸 ACA-C	0.21
18	CHT 1365 結腸 ACA-C	0.65
19	CLN 740 肝臓 N	0.19
20	CLN 741 肝臓 N	0.35
21	NDR 165 肝臓 N	0.81
22	NDR 150 肝臓 N	1.11
23	PIT 236 肝臓 N	1.04
24	CHT 1878 肝臓 N	1.30
25	CHT 119 Col 肝臓 Met	13.32
26	CHT 131 Col 肝臓 Met	0.95
27	CHT 218 Col 肝臓 Met	1.21
28	CHT 739 Col 肝臓 Met	0.84
29	CHT 755 Col 肝臓 Met	0.61
30	CHT 215 Col 腹部 Met	2.13

10

20

30

【 0 0 3 9 】

【 表 6 】

表 6:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	CHT 410 結腸 N	0.94
2	CHT 425 結腸 N	0.80
3	CHT 371 結腸 N	0.09
4	PIT 281 結腸 N	0.79
5	NDR 211 結腸 N	0.18
6	CHT 122 脾腫	2.08
7	CHT 887 脾腫	6.82
8	CHT 414 結腸 ACA-B	1.21
9	CHT 841 結腸 ACA-B	0.20
10	CHT 890 結腸 ACA-B	0.85
11	CHT 910 結腸 ACA-B	3.26
12	CHT 377 結腸 ACA-B	0.21
13	CHT 520 結腸 ACA-C	1.13
14	CHT 596 結腸 ACA-C	1.12
15	CHT 907 結腸 ACA-C	4.68
16	CHT 372 結腸 ACA-C	4.71
17	NDR 210 結腸 ACA-C	0.09
18	CHT 1365 結腸 ACA-C	0.32
19	CLN 740 肝臓 N	0.00
20	CLN 741 肝臓 N	0.17
21	NDR 165 肝臓 N	0.44
22	NDR 150 肝臓 N	0.47
23	PIT 236 肝臓 N	0.00
24	CHT 1878 肝臓 N	0.49
25	CHT 119 Col 肝臓 Met	8.14
26	CHT 131 Col 肝臓 Met	0.38
27	CHT 218 Col 肝臓 Met	0.47
28	CHT 739 Col 肝臓 Met	0.40
29	CHT 755 Col 肝臓 Met	0.27
30	CHT 215 Col 腹部 Met	0.50

10

20

30

【 0 0 4 0 】

【 表 7 】

表 7:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	CHT 371 結腸 N	0.02
2	CHT 523 結腸 N	0.24
3	NDR 104 結腸 N	1.88
4	CHT 520 結腸 ACA-C	0.77
5	CHT 1365 結腸 ACA-C	0.11
6	CHT 382 結腸 ACA-B	0.42
7	CHT 122 腺癌	8.34
8	CHT 077 肝臓-結腸 Mets	2.42
9	CHT 739 肝臓-結腸 Mets	0.06
10	CHT 755 肝臓-結腸 Mets	0.08
11	CHT001 肝臓-結腸 Mets	0.23
12	CHT 084 肝臓-結腸 Mets	0.17
13	CHT 113 肝臓-結腸 Mets	0.11
14	CHT 114 肝臓-結腸 Mets	1.32
15	CHT 127 肝臓-結腸 Mets	0.87
16	CHT 137 肝臓-結腸 Mets	115.82
17	CHT 218 肝臓-結腸 Mets	0.16
18	CHT 220 肝臓-結腸 Mets	0.17
19	CHT 324 肝臓-結腸 Mets	1.28
20	CHT 340 肝臓-結腸 Met	6.78
21	CHT 530 肝臓-結腸 Met	0.18
22	CHT 849 肝臓-結腸 Met	7.02
23	CHT 1637 肝臓-結腸 Met	0.31
24	CHT131 肝臓-結腸 Met	0.38
25	NDR 165 肝臓 正常	0.51
26	NDR 150 肝臓 正常	0.55
27	PIT 236 肝臓 正常	0.46

10

20

30

【 0 0 4 1 】

【 表 8 】

表 8:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	JDLD-1	61.21
2	DK01	31.14
3	DKS-8	21.20
4	DK04	6.68
5	JHCT116	69.35
6	HK2-6	59.95
7	HKe3	25.38
8	HKh2	23.77
9	e3Ham#9	29.46

40

【 0 0 4 2 】

【 表 9 】

表 9:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	HCT 116 Aphidl t=0	29.16
2	HCT 116 Aphidl t=3	30.19
3	HCT 116 Aphidl t=6	27.39
4	HCT 116 Aphidl t=9	26.19
5	HCT 116 Aphidl t=12	24.86
6	HCT 116 Aphidl t=15	15.20
7	HCT 116 Aphidl t=18	25.74
8	HCT 116 Aphidl t=21	26.37
9	HCT 116 Aphidl t=24	19.51
10	HCT 116 Noc t=0	26.37
11	HCT 116 Noc t=3	20.91
12	HCT 116 Noc t=6	22.72
13	HCT 116 Noc t=9	26.74
14	HCT 116 Noc t=15	30.50
15	HCT 116 Noc t=18	44.19
16	HCT 116 Noc t=21	46.55
17	HCT 116 Noc t=24	41.67
18	DLD noc t=3	44.97
19	DLD noc t=6	62.07
20	DLD noc t=9	79.94
21	DLD noc t=12	73.81
22	DLD noc t=15	99.79
23	DLD noc t=18	70.56
24	DLD noc t=21	74.58
25	A549 Mimo t=0	67.45
26	A549 Mimo t=3	62.28
27	A549 Mimo t=6	45.12
28	A549 Mimo t=9	41.67
29	A549 Mimo t=15	33.73
30	A549 Mimo t=18	29.56
31	A549 Mimo t=21	28.26
32	A549 Mimo t=24	27.97
33	MCF10A Mimo t=0	0.00
34	MCF10A Mimo t=3	0.00
35	MCF10A Mimo t=6	0.00
36	MCF10A Mimo t=9	0.00
37	MCF10A Mimo t=12	0.00
38	MCF10A Mimo t=18	0.00
39	MCF10A Mimo t=21	0.00
40	MCF10A Mimo t=24	0.00

10

20

30

40

【 0 0 4 3 】

【 表 1 0 】

表 10:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	SMAD4-SW480 C	2.17
2	SMAD4-SW480 24HR	4.27
3	SMAD4-SW480 48HR	4.91
4	SMAD4-SW480 72HR	1.62
5	L51747-ムチン	12.56
6	HT29 非ムチン	3.66
7	SW620 非ムチン	8.88
8	CSC-1 正常	5.08
9	NCM-460 正常	8.40
10	HCT116 RER+	14.89
11	SW48 RER+	20.69
12	SW480 RER-/-	9.82
13	CACO-2 RER-/-	4.89
14	JDLD-1	61.21
15	JHCT116	69.35
16	DK01	31.14
17	DK04	6.68
18	DKS-8	21.20
19	HKe3	25.38
20	HKh2	23.77
21	HK2-6	59.95
22	e3Ham#9	29.46
23	APC5 -/-	0.00
24	APC6 -/-	2.00
25	APC1+/+	0.31
26	APC13+/+	0.61

10

20

30

【 0 0 4 4 】

【 表 1 1 】

表 11:

サンプル 番号	組織型	相対的発現
1	SKOV-3 血清' 30	71.1
2	SKOV-3 No GF	86.9
3	SKOV-3 EGF ' 15	82.8
4	SKOV-3 EGF ' 30	75.9
5	SKOV-3 EGF ' 60	66.3
6	SKOV-3 Hrg ' 15	64.9
7	SKOV-3 Hrg ' 30	63.4
8	SKOV-3 Hrg ' 60	67.9
9	SKOV-3var No GF	76.9
10	SKOV-3var 血清' 30	98.8
11	SKOV-3var EGF ' 15	58.7
12	SKOV-3var EGF ' 30	60.2
13	SKOV-3var EGF ' 60	46.9
14	SKOV-3var Hrg 15'	62.3
15	SKOV-3var Hrg 30'	96.4
16	SKOV-3var Hrg 60'	71.8
17	HEY 形成性	0.6
18	HEY 軟寒天	0.0
19	SKOV-3	66.3
20	SKOV-3var	32.5
21	A2780	32.9
22	A2780-ADR	7.9
23	OVCAR-3	40.1
24	OVCAR-4	6.9
25	MDA2774	37.9
26	DOV13	17.8
27	Caov-3	6.7
28	ES-2	0.0
29	HEY 0 時間	2.6
30	HEY 1 時間	2.5
31	HEY 3 時間	3.6
32	HEY 6 時間	2.8
33	HEY 9 時間	2.6
34	HEY 12 時間	1.4
35	SKOV-3 形成性	167.2
36	SKOV-3 SubQ 腫瘍	19.1
37	SKOV-3 変異体 形成性	135.8
38	SKOV-3 Var SubQ 腫瘍	1.5
39	MDA 127 正常な卵巣	0.3
40	MDA 224 正常な卵巣	0.1
41	MDA 124 卵巣腹水	0.2
42	MDA 126 卵巣腹水	53.8

本発明は、細胞増殖障害（例えば、乳癌、卵巣癌、肺癌、および／または結腸癌）の診断および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、25943遺伝子（グリコシルアスパラギナーゼ）の発現が、腫瘍（例えば、卵巣腫瘍、肺腫瘍、乳房腫瘍、および結腸腫瘍）においてアップレギュレートされるという発見に少なくとも一部基づく。本発明は、さらに、25943発現が、細胞周期の間に調節されるという発見に少なくとも一部基づく。本発明は、なおさらに、25943が、タンパク質の翻訳後修飾およびプロセシングに関与し得るという発見に少なくとも一部基づく。機構により制限されることを意

10

20

30

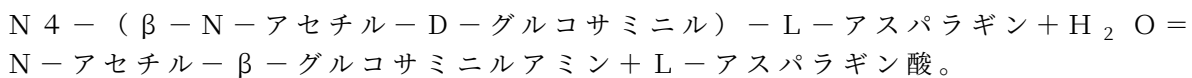
40

50

図することなく、25943活性の調節（例えば、阻害）は、腫瘍形成能力に関係する腫瘍細胞におけるタンパク質調節（例えば、翻訳後修飾およびプロセッシング）を調節（例えば、阻害）し得る（従って、細胞増殖および腫瘍形成を調節（例えば、阻害）する）と考えられる。

【0045】

25943は、主に、リソソームにおける、糖タンパク質の分解に関与する、グリコシルアスパラギナーゼと呼ばれる酵素のクラスのメンバーである。一般的に、これらの型の酵素の欠損は、部分的に分解したオリゴサッカリドおよび糖タンパク質の蓄積を引き起こす。グリコシルアスパラギナーゼ（アスパルチルグルコサミニダーゼとも呼ばれる）の欠損はまた、アスパルチルグルコサミン尿症として公知のリソソーム貯蔵疾患を生じる。グリコシルアスパラギナーゼファミリーの酵素は、多機能の特性、および広範な基質特異性を有する。グリコシルアスパラギナーゼは、アスパラギン-連結糖タンパク質のタンパク質-糖質連結の切断を触媒する原因である。グリコシルアスパラギナーゼはまた、 β -アスパルチルペプチドの加水分解を触媒して、アスパラギン酸およびアミノ酸またはペプチドを形成し得る。次いで、アスパラギン酸（4個の炭素のアミノ酸）は、オキサロ酢酸に転換され、このオキサロ酢酸は、クエン酸回路（ATPの生成のために主な経路かつアミノ酸の合成のための中間体の供給源）を開始するために用いられる。グリコシルアスパラギナーゼが触媒する一般的な反応は、以下の通りである：



【0046】

本発明の方法に従って同定された25943モジュレーターは、細胞増殖（例えば、乳房細胞、卵巣細胞、肺細胞および／または結腸細胞における）を調節するために用いられ得、そして、従って、細胞増殖障害の処置、診断、または予後判定に有用である。例えば、25943分子の活性の阻害は、細胞増殖を阻害し得、それにより、被験体における腫瘍形成を阻害する。従って、本明細書中に記載されるアッセイを用いて同定された25943モジュレーターは、細胞増殖障害（例えば、癌）および／またはこのような障害の次に起こる細胞増殖疾患を処置するために用いられ得る。あるいは、25943モジュレーターは、被験体における25943活性を増大させることにより、細胞増殖を増大し得る。従って、25943モジュレーターはまた、望ましくない細胞死（例えば、神経変性障害）の処置に有用である。

【0047】

本明細書中で使用される場合、「細胞増殖性障害」は、細胞増殖、成長、アポトーシス、分化、および／または移動のプロセスに影響を及ぼす障害を含む。本明細書中で使用される場合、「細胞増殖、成長、アポトーシス、分化、および／または移動のプロセス」は、それにより、細胞の数、サイズもしくは容積が増加するか、細胞が、プログラムされた細胞死を受けるか、細胞が、他の細胞の特徴と異なる特殊化された一組の特徴を発生させるか、または細胞が、特定の場所もしくは刺激の近くもしくは遠くへと移動する、プロセスである。細胞増殖性障害の例としては、癌（例えば、乳癌、結腸癌、肺癌、卵巣癌、および他の型の癌腫、肉腫、リンパ腫、および／または白血病）；腫瘍新脈管形成および転移；骨格形成異常；肝臓障害；ならびに造血障害および／または骨髓増殖性障害が挙げられる。アポトーシスの異常な調節により特徴付けられる障害の他の例としては、発作関連細胞死および神経変性障害（例えば、アルツハイマー病、アルツハイマー病関連痴呆（例えば、ピック病）、パーキンソン病およびその他のレーヴィ体びまん性疾患）、老年痴呆、ならびにハンティングトン病が挙げられる。

【0048】

本明細書中で交換可能に使用される場合、「25943活性」、「25943の生物学的活性」、または「25943の機能的活性」は、25943応答性細胞もしくは組織（例えば、胸部、卵巣、肺または結腸）に対して、または25943タンパク質基質（標準的な技術に従って、インビボもしくはインビトロで決定される）に対して、25943タン

10

20

30

40

50

パク質、25943ポリペプチドまたは25943核酸分子により及ぼされる活性を含む。25943活性は、直接的活性（例えば、25943標的分子との結合）であり得る。本明細書中で使用される場合、「基質」または「標的分子」または「結合パートナー」は、天然で25943タンパク質と結合または相互作用し、その結果、25943媒介機能（例えば、タンパク質-炭水化物連結の調節）が達成される、分子である。25943標的分子は、非25943分子（例えば、炭水化物連結タンパク質）、または25943タンパク質もしくは25943ポリペプチドであり得る。このような標的分子の例としては、25943タンパク質と同じシグナル伝達経路にあるタンパク質（例えば、細胞増殖の調節を含む経路において25943タンパク質の上流で機能し得るタンパク質（活性の刺激因子およびインヒビターの両方を含む）または下流で機能し得るタンパク質）が挙げられる。あるいは、25943活性は、25943タンパク質と25943標的分子との間の相互作用により媒介される細胞シグナル伝達活性のような、間接的な活性である。25943生物学的活性は、本明細書中に記載される。例えば、25943タンパク質は、以下の活性の1つ以上を有し得る：1）アスパラギン連結糖タンパク質のタンパク質-炭水化物連結部の加水分解を調節する；2） β -アスパルチルペプチドの、アスパラギン酸、ならびにアミノ酸および／またはペプチドへの加水分解を調節する；3）クエン酸回路を調節する；4）タンパク質の翻訳後修飾および／もしくはプロセッシングを調節する；ならびに／または5）（例えば、胸部細胞、卵巣細胞、肺細胞および／または結腸細胞における）細胞増殖、成長、アポトーシス、分化、および／または移動を調節する。

10

【0049】

20

本発明の種々の局面は、以下の小節にさらに詳細に記載される。

【0050】

（I. スクリーニングアッセイ）

本発明は、25943タンパク質に結合するか、25943発現もしくは25943活性に対して刺激性活性もしくは阻害性活性を有するか、または25943標的分子の発現もしくは活性に対して刺激性もしくは阻害性の影響を有する調節因子（すなわち、候補化合物もしくは試験化合物もしくは候補因子もしくは試験因子（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子、リボザイム、または25943アンチセンス分子））を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」ともいう）を提供する。本明細書中に記載されるアッセイを使用して同定される化合物は、細胞増殖障害を処置するのに有用であり得る。

30

【0051】

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

40

【0052】

本発明の試験化合物は、当該分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の任意のアプローチを使用して得られ得る。これらのライブラリー法としては、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間アドレス可能な平行固相ライブラリーまたは溶液相ライブラリー；デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化

50

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法。この生物学的ライブラリーアプローチは、ペプチドライブラリーに限られるが、その他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

【0053】

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

【0054】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Houghten (1992) *Biochemical Techniques* 13:412-421）、またはビーズ上（Lam (1991) *Nature* 354:82-84）、チップ上（Fodor (1993) *Nature* 364:555-556）、細菌上（Ladner *USP* 5,223,409）、胞子上（Ladner *USP* '409）、プラスミド上（Cullら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869）もしくはファージ上（ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386-390；Devlin (1990) *Science* 249:404-406；Cwirllaら (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382；Felicci (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310；Ladner前出）に呈示され得る。

【0055】

一局面において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、このアッセイにおいて、25943タンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞は、試験化合物と接触されて、そしてその試験化合物が25943活性の調節能力が決定される。好ましい実施形態において、25943タンパク質の生物学的に活性な部分として、タンパク質-炭水化物連結の加水分解を調節し得るドメインまたはモチーフが挙げられる。試験化合物が25943活性を調節する能力を決定することは、以下により達成され得る：例えば、1つ以上の特定の代謝物（例えば、遊離炭水化物、Asn-GlcNAc、アスパラギン酸、アミノ酸、および／またはペプチド）の産生をモニタリングすること；細胞周期調節遺伝子の発現を測定すること；または細胞増殖をモニタリングすること。細胞は、例えば、哺乳動物起源（例えば、胸部細胞、肺細胞、卵巣細胞または結腸細胞）であり得る。

【0056】

基質に対する25943の結合を調節する試験化合物の能力もまた決定され得る。基質（例えば、Asn連結糖タンパク）に対する25943の結合を調節する試験化合物の能力を決定することは、例えば以下により達成され得る：25943基質の25943への結合が、複合体中の標識された25943基質を検出することにより決定され得るように、放射性同位体、蛍光標識、または酵素標識と25943基質をカップリングすること。あるいは、25943を放射性同位体または酵素標識とカップリングして、複合体中の25943基質に対する25943の結合を調節する試験化合物の能力をモニタリングし得る。25943に結合する試験化合物の能力を決定することは、例えば、以下により達成され得る：25943へのこの化合物の結合が、複合体中の標識された25943化合物を検出することにより決定され得るように、放射性同位体または酵素標識とこの化合物とをカップリングすること。例えば、25943基質は、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで、直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてこの放射性同位体は、放射

線の直接的計数またはシンチレーション計数により検出される。あるいは、化合物は、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そして酵素的標識は、適切な基質の産物への変換の測定により検出される。

【0057】

相互作用するもののいずれも標識することなく、25943と相互作用する化合物の能力決定することもまた、本発明の範囲内である。例えば、微視的生理機能測定器を使用して、化合物または25943のいずれも標識することなく、25943との化合物の相互作用を検出し得る(McConnell, H. M. ら(1992) Science 257: 1906-1912)。本明細書中で使用される場合、「微視的生理機能測定器(microphysiometer)」(例えば、細胞センサー(Cytosensor))は、光アドレス可能な電位差計センサー(LAPS)を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物と25943との間の相互作用の指標として使用し得る。

10

【0058】

25943発現は、腫瘍(転移性腫瘍を含む)で増加し、かつ細胞周期の間に調節されるので、細胞増殖を調節する化合物は、25943発現を調節する能力により同定され得る。試験化合物が25943発現を調節するか否かを決定するために、25943を発現する細胞(例えば、胸部腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、または対応する正常細胞)を試験化合物と接触させ、そして試験化合物が25943発現を調節する能力を、例えば、ノーザンブロット、定量的PCR(例えば、Taqman)、またはインビトロ転写アッセイにより、25943 mRNAを測定することにより決定し得る。インビトロ転写アッセイを実行するために、全長プロモーターおよび25943のエンハンサーをレポーター遺伝子(例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)またはルシフェラーゼ)に連結し得、そして宿主細胞に導入し得る。次いで、同じ宿主細胞が試験化合物でトランスフェクトされ得るかまたは試験化合物と接触され得る。試験化合物の効果は、レポーター遺伝子活性、およびこの活性を、その試験化合物を含有しない細胞におけるレポーター遺伝子活性と比較することにより測定され得る。レポーター遺伝子活性における増減は、25943発現の調節を示しており、従って、試験化合物が細胞増殖を調節する能力の指標である。

20

30

【0059】

試験化合物が25943発現を調節する能力はまた、試験化合物と接触させた細胞に存在するグリコシルアスパラギナーゼ活性を測定することにより決定され得る。試験化合物が25943グリコシルアスパラギナーゼ活性を調節するか否かを決定するために、25943を発現する細胞(例えば、胸部腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、または対応する正常細胞)を試験化合物と接触させ、そしてこの試験化合物が25943グリコシルアスパラギナーゼ活性を調節する能力を、例えば、GlcNAcのレベルを測定することにより決定し得る。25943グリコシルアスパラギナーゼ活性を測定するための例示的な方法は、実施例4~7および9~10に詳細に記載される。

【0060】

結腸癌進行に関連することが公知の腫瘍サプレッサおよびオンコジーンで一時的にトランスフェクトされた細胞株および安定にトランスフェクトされた細胞株は、25943調節因子の同定のための本発明の方法において有用であり得る(例えば、Smad4で安定にかまたは一時的にトランスフェクトされたSW480細胞)。Smad4は、結腸癌腫のサブセットにおいて変異された候補腫瘍サプレッサ遺伝子である。Smad4は、TGF- β 分子のシグナル伝達において機能する。TGF- β スーパーファミリーが、成長阻害に関与することは周知である。結腸細胞株におけるSmad4変異/損失は、Smad4が、細胞接着および浸潤の調節因子であり得るという仮説を提供する。本発明の方法において有用な他の細胞株は、 β -カテニンで安定にかまたは一時的にトランスフェクトされたNCM425細胞である。APC遺伝子の変異は、結腸直腸癌の散发性形態および家族

40

50

性形態での腫瘍形成に対して応答性である。A P Cは、 β -カテニンに結合し、そして β -カテニンの細胞質レベルを調節する。A P Cが変異される場合、 β -カテニンは、細胞質に蓄積し、そして核に転座する。一旦、核に入ると、L E F / T C F分子と相互作用し、そして遺伝子発現を調節する。 β -カテニン / L E F複合体により調節される遺伝子は、c - m y cおよびサイクリンD 1と同様に、腫瘍形成に関与する。p 5 3で安定にかまたは一時的にトランスフェクトされた細胞もまた、本発明の方法において有用である。p 5 3は、周知の腫瘍サプレッサであり、結腸直腸癌腫の5 0 %より多くにおいて変異される。

【0061】

細胞周期調節およびそのチェックポイントにおける異常性は、悪性の細胞の発生をもたらす。細胞増殖および細胞周期停止を調節するシグナルに応答する細胞の能力の損失は、癌の共通の機構である。従って、細胞周期内の特定の時点の研究のために、結腸癌細胞株H C T 1 1 6、D L D - 1およびN C M 4 2 5のような細胞株は、アフジコリン (A p h i d i c o l i n) (G 1ブロック)、ミモシン (M i m o s i n e) (G 1ブロック) およびノコダゾール (N o c o d a z o l e) (G 2 / Mブロック) のような薬剤を用いて同期化され得る。

10

【0062】

本発明の方法において有用な他の細胞株には、破壊されたk - r a s 遺伝子を含む結腸癌細胞株H C T 1 1 6およびD L D 1が含まれた。このk - r a s オンコジーンを活性化する点変異は、ヒト結腸癌の5 0 %で見出される。活性化k - r a s は、結腸直腸腫瘍における細胞増殖を調節し得る。H C T 1 1 6細胞およびD L D 1細胞における活性化k - r a s 対立遺伝子を破壊することにより、形態学的に分化が変更され、足場非依存性増殖の損失を生じ、インビトロおよびインビボでの増殖が遅くなり、そしてc - m y c の発現が減少される。本発明の方法において有用なさらに他の細胞株としては、W I S P - 1 のN C M 4 2 5 結腸癌細胞への一過性または安定なトランスフェクション、D C C、C o x 2、および / またはA P Cの種々の細胞への一過性または安定なトランスフェクションが挙げられる。

20

【0063】

2 5 9 4 3 活性を調節する化合物を同定するために使用され得るアッセイはまた、細胞増殖を調節する化合物の能力について試験するアッセイを含む。細胞増殖を調節する試験化合物の能力は、2 5 9 4 3 を発現する細胞 (例えば、胸部腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または結腸腫瘍細胞のような、胸部細胞、卵巣細胞、肺細胞または結腸細胞) における増殖を調節するその能力により測定され得る。例えば、細胞増殖を調節する試験化合物の能力は、細胞 (例えば、胸部腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または結腸腫瘍細胞) をその試験化合物と接触させること、その細胞を一定期間インキュベートすること、および試験化合物と接触されないコントロール細胞と比較して存在する細胞の数を測定することにより測定され得る。細胞の数は、例えば、乾燥 / 湿潤重量測定 (実施例 1 を参照のこと)、光学密度による細胞の計数 (実施例 2 を参照のこと)、計数チャンバの使用 (実施例 3 を参照のこと)、またはC o u l t e r カウンターの使用により、測定され得る。細胞増殖を調節する試験化合物の能力はまた、細胞 (例えば、胸部腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または結腸腫瘍細胞) を試験化合物と接触させること、およびその細胞が軟質寒天においてコロニーを形成する能力を試験すること (実施例 8 を参照のこと) により測定され得る。軟質寒天において増殖する細胞の能力は、その細胞の足場依存性増殖の必要性 (腫瘍形成可能性の指標) が無くなったことを示す。細胞増殖を調節する試験化合物の能力はまた、細胞 (例えば、胸部腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、肺腫瘍細胞または結腸腫瘍細胞) を試験化合物と接触させること、およびその細胞がヌードマウスにおいて腫瘍を形成する能力を試験することにより測定され得る。このヌードマウス (1 9 6 2 年に発見された無毛変異体) は、免疫不全であり、従って、他の種からの腫瘍移植を拒絶しない。

30

40

【0064】

50

細胞増殖を測定するための多数の他の方法が、当該分野に存在する。例としては、以下が挙げられる：比色分析アッセイを使用する、ホルマザン塩に対するWST-8還元を介する生存細胞の代謝活性の測定（Alexis Biochemicals (San Diego, CA) 製またはDojindo Molecular Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) 製のCell Counting Kit-8；抗BrdUモノクローナル抗体／セイヨウワサビペルオキシダーゼを基本とする検出系（Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) によるCell Proliferation ELISAまたはImmunocytochemistry）を使用するBrdU取り込みによるDNA合成の測定； $[^1\ ^4\text{C}]$ チミジン取り込みによるDNA合成（Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) によるThymidine Uptake $[^1\ ^4\text{C}]$ Cytostar-T Assay）；および $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みのシンチレーション近接アッセイ（SPA）により測定されるDNA合成（Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) 製の $[^3\text{H}]$ Thymidine Uptake Assay Kit）。

10

【0065】

細胞増殖を測定するための方法のさらなる例としては、以下が挙げられる：同時細胞表面マーカーおよび細胞内BrdU取り込みの測定（BD Biosciences (San Jose, CA) 製のFast Immune Anti-BrdU with Dnaase）；比色分析アッセイを使用する、可溶性ホルマザン塩に対するWST-1還元を介する生存細胞の代謝活性の測定（BioVision, Inc. (Mountain View, CA) 製のQuick Cell Proliferation Assay Kit）；Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) 製のCell Proliferation Assay Kit；Oncogene Research Products (San Diego, CA) によるRapid Cell Viability Assay；R&D Systems (Minneapolis, MN) 製のCell Proliferation Reagent WST-1）；「Cyto-dye」で染色した生存細胞およびヨウ化プロピジウムで染色した死細胞の測定（BioVision, Inc. (Mountain View, CA) 製のLive/Dead Cell Staining Kit）；ならびにATPの生物発光検出を使用する代謝活性の測定（BioVision, Inc. (Mountain View, CA) 製のApoSENSOR ATP Determination Kit；LumiTechのViaLight HS Assay、LumiTechのViaLight HT Assay、およびLumiTechのViaLight MDA Assay（全てBioWhittaker (Walkersville, MD)）；Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA) 製のCytoLux Assay Kit；Thermo LabSystems (Franklin, MA) 製のCytotoxicity and Cell Proliferation Kit）。

20

30

【0066】

細胞増殖を測定するための方法のさらなる例としては、以下が挙げられる：比色分析アッセイを使用するホルマザン塩に対するMTT還元を介する生存細胞の代謝活性の測定（Chemicon International, Inc. (Temecula, CA) 製のMTT Cell Growth Assay Kit；Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) 製のVybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit；Promega (Madison, WI) によるCellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay；TACS MTT Cell Proliferation and Viability AssayおよびCell Proliferation Kit I MTT（両方ともR&D Systems (Minneapolis, MN) 製のCell Proliferation Assay Kit）。

40

50

olis, MN) 製) ; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製の In Vitro Toxicology Assay Kit (MTTベース) ; カルセイン (calcein) - AM で染色された生存細胞およびヨウ化プロピジウムで標識された死滅細胞の測定 (Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) 製の Cellstain Double-Staining Kit) ; CyQUANT GR 色素を使用する DNA 含量の測定 (Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) 製の CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit) ; ELISA-ベースの化学発光検出を使用する、BrdU 取り込みによる DNA 合成の測定 (Oncogene Research Products (San Diego, CA) による BrdU Cell Proliferation Assay ; R&D Systems (Minneapolis, MN) による Cell Proliferation ELISA, BrdU (化学発光)) ; ならびに ELISA-ベースの比色分析検出を使用する、BrdU 取り込みによる DNA 合成の測定 (Oncogene Research Products (San Diego, CA) による BrdU Proliferation Assay-HTS ; BrdU Labeling and Detection Kit III および Cell Proliferation ELISA, BrdU (比色分析) (両方とも、R&D Systems (Minneapolis, MN)) 。

10

20

【0067】
細胞増殖の測定のための方法のさらなる例としては、以下が挙げられる：ビオチン化抗 PCNA モノクローナル抗体を使用する増殖性細胞核抗原 (PCNA) の測定 (Oncogene Research Products (San Diego, CA) による (PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ELISA) ; 抗 BrdU モノクローナル抗体を使用する BrdU 取り込み検出による DNA 合成の測定 (Oncogene Research Products (San Diego, CA) 製の BrdU IHC System ; Zymed Laboratories, Inc. (South San Francisco, CA) 製の BrdU Kit) ; BrdU 取り込みにより同定されるブレーキ部位と共に、鎖切断誘導光分解 (Strand Break Induced Photolysis) (SBIP) 法を使用する BrdU 取り込みによる DNA 合成の測定 (Phoenix Flow Systems Inc. (San Diego, CA) 製の ABSOLUTE-S SBIP Cell Proliferation Assay Kit) ; 比色分析アッセイを使用する、可溶性ホルマザン塩に対する MTS 還元を介する生存細胞の代謝活性の測定 (Promega (Madison, WI) による CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay ; および比色分析アッセイを使用する、ホルマザン塩に対する MTS 還元を介する生存細胞の代謝活性の測定 (Promega (Madison, WI) による CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay) 。

30

40

【0068】
細胞増殖を測定するための方法のさらなる例としては、以下が挙げられる：ルシフェリンおよび熱安定ルシフェラーゼを使用する ATP の生物発光を介する代謝活性の測定 (Promega (Madison, WI) による CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay) ; 直接的免疫蛍光染色 (In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS および BrdU Labeling and Detection Kit I (両方とも R&D Systems (Minneapolis, MN) 製)、または間接的免疫染色法 (R&D Systems (Minneapolis, MN) 製の BrdU Labeling and Detection Kit II) による単一の細胞の増殖の測定 ; 比色分析

50

アッセイを使用する、可溶性ホルマザン塩に対するX T T還元を介する生存細胞の代謝活性の測定 (R & D Systems (Minneapolis, MN); Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (X T Tベース)) ; 増殖細胞においてのみ発現される核細胞周期関連抗原の検出 (R & D Systems (Minneapolis, MN) 製のMonoclonal Antibodies to Cell Cycle-Associated Antigens) ; 形質膜色素を使用する細胞増殖の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のCell Census Plus System) ; ならびにp-ニトロフェニルホスフェートの着色化合物への転換を介する膜結合ホスファターゼ活性の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (酸ホスファターゼベース)) 。 10

【0069】

細胞増殖を測定するための方法のなおさらなる例としては、以下が挙げられる：比色分析アッセイを使用する、生存細胞のニュートラルレッド色素染色の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (ニュートラルレッドベース)) ; 比色分析アッセイを使用するスルホローダミン色素結合に対する全タンパク質の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (スルホローダミンBベース)) ; 比色分析アッセイを使用する、ホルマザン誘導体に対するテトラゾリウム還元により測定される生存細胞の代謝活性の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (乳酸デヒドロゲナーゼベース)) ; 酸化体 (青色) から蛍光性中間体 (赤色) へ変換する色素の生体還元を介する生存細胞の代謝活性の測定 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 製のIn Vitro Toxicology Assay Kit (リザズリンベース)) ; Quantos色素試薬を使用するDNA含量の測定 (Stratagene (La Jolla, CA) 製のQuantos Cell Proliferation Assay Kit) ; およびA : T塩基対結合色素によるDNA含量の測定 (TACS Hoechst Cell Proliferation Assay 1 (CPA1) およびTACS Hoechst Cell Proliferation Assay 2 (CPA2) (両方とも、Trevigen, Inc. (Gaithersburg, MD) 製)) 。 20 30

【0070】

さらに別の実施形態において、本発明のアッセイは、25943タンパク質またはその生物学的に活性な部分が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物の、25943タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合するかまたはこれらの活性を調節する (例えば、刺激するかまたは阻害する) 能力が決定される、無細胞アッセイである。本発明のアッセイにおいて使用される25943タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分は、非25943分子との相互作用に関与するフラグメント (例えば、高い表面可能性スコアを有するフラグメント) を含む。試験化合物の25943タンパク質への結合は、上記のように直接的または間接的のいずれかで決定され得る。25943タンパク質が試験化合物に結合する能力を決定することはまた、real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander, S. およびUrbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63 : 2338-2345 ; Szaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5 : 699-705) のような技術を用いて達成され得る。本明細書中で使用される場合、「BIA」は、いずれの相互作用体 (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体を研究するための技術である。表面プラズモン共鳴 (SPR) の光学的現象 (optical phenomenon) の変化は、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。 40 50

【0071】

なお別の実施形態において、この無細胞アッセイは、25943タンパク質またはその生物学的に活性な部分と、25943タンパク質と結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物（例えば、25943基質）とを接触させること、このアッセイ混合物と試験化合物とを接触させること、および試験化合物が25943タンパク質と相互作用する能力を決定することを包含し、ここで試験化合物が25943タンパク質と相互作用する能力を決定することは、25943タンパク質の、25943標的タンパク質（例えば、25943基質）に優先的に結合するか、または25943標的分子の活性を調節する能力を決定することを包含する。

【0072】

本発明の無細胞アッセイは、単離されたタンパク質（例えば、25943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／または膜結合形態の両方の使用になじみやすい。単離されたタンパク質の膜結合形態が使用される無細胞アッセイの場合、単離されたタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を使用することが所望され得る。このような可溶化剤の例としては、非イオン性界面活性剤（例えば、*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）、イソトリデシポリ（エチレングリコールエーテル）_n（Isotridecypoly（ethylene glycol ether）_n）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート（3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamminio]-1-propane sulfonate）（CHAPS）、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート（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）が挙げられる。

【0073】

本発明の上記のアッセイ方法の1つより多くの実施形態において、25943または25943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25943タンパク質への結合、または試験化合物の存在下および非存在下での25943タンパク質の25943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／25943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25943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に関する生理学的条件）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、複合体形成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25943結合レベルまたは25943活性レベルを標準的な技術を使用して決定し得る。

【0074】

タンパク質または細胞膜調製物をマトリックス上に固定するための他の技術はまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、25943タンパク質または25943標的分子のいずれかは、ビオチンとストレプトアビジンとの結合体化を使用し

10

20

30

40

50

て固定され得る。ビオチン化された25943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。あるいは、25943タンパク質または標的分子と反応性であるが、25943タンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体は、プレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的または25943タンパク質が、抗体の結合体化によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体に関しての上記のものに加えて、25943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25943タンパク質または標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

10

【0075】

本発明のなお別の局面において、25943タンパク質またはそのフラグメントは、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイ（例えば、米国特許第5,283,317号；Zervosら、(1993) Cell 72:223~232；Maduraら(1993) J. Biol. Chem. 268:12046~12054；Bartelら(1993) Biotechniques 14:920~924；Iwabuchiら(1993) Oncogene 8:1693~1696；およびBrent WO94/10300を参照のこと）において、25943と結合または相互作用し、25943活性に関与する他のタンパク質（「25943結合タンパク質」または「25943-bp」）を同定するために「ベイト（bait）タンパク質」として使用され得る。そのような25943結合タンパク質は、例えば、25943媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、25943タンパク質または25943標的によるシグナルの伝達に関与している可能性もある。あるいは、そのような25943結合タンパク質は、25943インヒビターである可能性がある。

20

【0076】

このツーハイブリッドシステムは、ほとんどの転写因子のモジュラー型の性質に基づく。ほとんどの転写因子は、別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる。簡単に述べると、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物において、25943タンパク質をコードする遺伝子が、既知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他の構築物において、同定されていないタンパク質（「プレイ（prey）」または「サンプル」）をコードするDNA配列ライブラリー由来のDNA配列が、既知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」タンパク質と「プレイ」タンパク質とがインビボで相互作用して25943依存性複合体を形成し得る場合、その転写因子のDNA結合ドメインと活性化ドメインとは、近接する。このように近くにあることにより、その転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結したレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写が可能になる。そのレポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてその機能的な転写因子を含む細胞コロニーが、単離され得、そして25943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遺伝子を得るために使用され得る。

30

40

【0077】

別の局面において、本発明は、本明細書中に記載されるアッセイのうちの2つ以上の組み合わせに関する。例えば、調節剤が、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定され得、そしてその因子が25943タンパク質の活性を調節する能力が、例えば、本明細書中の他所に記載されるように、動物（例えば、腫瘍形成についての動物モデル）においてインビボで確認され得る。さらに、25943を欠損した動物（例えば、25943ノックアウトマウス）は、25943により調節される経路を介して細胞増殖を調節する能力を欠損し得、従って、25943をバイパスし、そして試験化合物がこの経路の下流の成分の活性を直接調節することによって増殖を調節し得るか否かを決定する際に

50

有用であり得る。

【0078】

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、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因子をさらに使用することは、本明細書中に範囲内にある。例えば、本明細書中に記載されるように同定された因子（例えば、25943調節因子、アンチセンス25943核酸分子、25943特異的抗体、または25943結合パートナー）が、そのような因子を用いる処置の効力、毒性、または副作用を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。あるいは、本明細書中に記載されるように同定される因子が、そのような因子の作用機構を決定するために動物モデルにおいて使用され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載されるような処置のために、上記のスクリーニングアッセイにより同定された新規な因子の使用に関する

例えば、薬剤が25943タンパク質の活性を調節する能力は、細胞増殖障害（例えば、腫瘍形成）についての動物モデルのような動物において試験され得る。インビボでの腫瘍形成を研究するための他の動物ベースのモデルは、当該分野で周知であり（Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes、Hiai、HおよびHino、O（編）1999、Progress in Experimental Tumor Research、第35巻；Clarke A. R.（2000）Carcinogenesis 21：435-41において概説されている）、そして例えば、発癌物質誘導腫瘍（Rithidech、K.ら（1999）Mutat. Res. 428：33-39；Miller、M. L.ら（2000）Environ. Mol. Mutagen. 35：319-327）、動物への腫瘍細胞の注射および／または移植、ならびに増殖調節遺伝子（例えば、癌遺伝子（例えば、ras）（Arbeit、J. M.ら（1993）Am. J. Pathol. 142：1187-1197；Sinn、E.ら（1987）Cell 49：465-475；Thorgeirsson、SSら（2000）Toxicol. Lett. 112-113：553-555）および腫瘍抑制遺伝子（例えば、p53）（Vooijs、M.ら（1999）Oncogene 18：5293-5303；Clark A. R.（1995）Cancer Metast. Rev. 14：125-148；Kumar、T. R.ら（1995）J. Intern. Med. 238：233-238；Donehower、L. A.ら（1992）Nature 356 215-221））において変異を有する動物が挙げられる。さらに、実験モデル系は、例えば、卵巣癌（Hamilton、T. C.ら（1984）Semin. Oncol. 11：285-298；Rahman、N. A.ら（1998）Mol. Cell. Endocrinol. 145：167-174；Beamer、W. G.ら（1998）Toxicol. Pathol. 26：704-710）、胃癌（Thompson、J.ら（2000）Int. J. Cancer 86：863-869；Fodde、R.ら（1999）Cytogenet. Cell Genet. 86：105-111）、乳癌（Li、M.ら（2000）Oncogene 19：1010-1019；Green、J. E.ら（2000）Oncogene 19：1020-1027）、骨髄腫（Satyamoorthy、K.ら（1999）Cancer Metast. Rev. 18：401-405）、肺癌（Malkinson、A. M.（2001）Lung Cancer 32（3）：265-79；Zhao、B.ら（2001）Exp. Lung Res. 26（8）：567-79）；結腸癌（Takeito、M. M.およびTakaku（2000）Hum. Cell 13（3）：85-95；Fodde、R.およびSmits、R.（2001）Trends. Mol. Med. 7（8）：369-73）；および前立腺癌（Shirai、T.ら（2000）Mutat. Res. 462：219-226；Bostwick、D. G.ら（2000）Prostate 43：286-294）の研究のために利用可能である。本発明の方法において有用であり得る他の動物モデルとしては、グリコシルアスパラギナーゼ遺伝子中にヌル変異を有するマウスが挙げられる（Kaartine

10

20

30

40

50

n, V. ら (1996) Nat. Med. 2: 1375-1378)。

【0079】

癌についてのさらなるマウスモデルの例を、以下に詳述する。例えば、Apc^{mi} マウスは、ヒト結腸直腸発癌の最も徹底的に特徴付けられた遺伝的モデルである。このモデルは、Apcの門番機能の喪失から生じる初期段階の疾患に関連する遺伝子発現の変化を同定するための、価値あるツールを提供する。これらのマウス由来の腺腫様ポリープおよび正常結腸上皮は、標準的なcDNAライブラリーおよびサブトラクティドcDNAライブラリーの構築ならびにマイクロアレイ分析のためのプローブ生成のために、回収され得る。Apc^{1638N} マウスを、Apc遺伝子のコドン1638でPGK-ネオマイシン遺伝子を導入することによって作製した。6~8週間後、これらのマウスは、異常な窩病巣 (crypt focus) を形成し、この窩病巣は、最終的には4月齢までに癌腫に進行する。これらのマウスは、胃腸管上部内に平均5~6個の腫瘍を発症する。さらに、これらのマウスはまた、腸の外の腫瘍およびデスモイドを発症する。この系統は、家族性腺腫様ポリーポシス (FAP) 患者中に見られる結腸外の徴候 (例えば、デスモイド疾患) の研究手段を提供する。Smad3^{-/-} マウスは、最近、ヒト結腸直腸発癌についての有用かつ独自のモデルとして記載されている。Smad3^{-/-} マウスは、ヒト疾患に組織病理学的に類似する結腸癌腫を発症する。このモデルの1つの利点は、疾患進行のいくつかの段階 (正常上皮、増殖性上皮、腺腫様ポリープ、ならびに種々の程度 of 原発性癌腫およびリンパ節転移) 由来のサンプルが単離され得ることである。従って、サブトラクティドcDNAライブラリーおよびこれらの段階を示すプローブの生成は、結腸癌標的を同定および確認するための強力なツールである。

【0080】

ミスマッチ修復モデル (MMR) もまた、本発明の方法において有用である。DNAミスマッチ修復に参与する遺伝的非ポリーポシス結腸癌 (HNPCC) (これは、MSH2およびMLH1における生殖細胞系列の変異によって引き起こされる) 遺伝子は、結腸癌の症例の5~15%を占める。MLH1遺伝子、MSH2遺伝子およびMSH3遺伝子中にヌル変異を保有するマウスモデルが作製されている。

【0081】

異種移植マウスモデルは、マウス (例えば、ヌードマウス) 中に、結腸腫瘍細胞由来の細胞を移植することによって作製される。このような遺伝子は、抗癌薬物開発のための重要な標的であり得る。異種移植マウスモデルを作製するために本発明の方法において使用され得る結腸腫瘍細胞株の例としては、HCT116、HT29、SW480、SW620、Colon 26、DLD1、Caco2、colo205、T84、CC-ML3、KM12C、KM12SM、HCC-2998、HCT-15、KM20L2およびKM12が挙げられる。

【0082】

本発明の方法において使用され得る卵巣腫瘍細胞株の例としては、細胞株SKOV3、SKOV3/Variant、OVCAR-3、OVCAR-4およびHEYが挙げられる。SKOV3/Var細胞株は、シスプラチンに対して耐性の親細胞株SKOV3の改変体である。

【0083】

HCT-116ヒト結腸癌腫細胞株は、無胸腺ヌードマウスにおいて皮下異種移植片または同所性異種移植片 (盲腸内 (intracaeal) 注射) として増殖し得るが、低い頻度で転移する。まれな肝臓および肺の転移が単離され得、インビトロで増殖され得、そしてインビボで再移植され得る。このプロセスの限定数 (1~3) の反復が使用されて、親細胞株の非常に転移性の改変体を単離し得る。標準的なcDNAライブラリーおよびサブトラクティドcDNAライブラリーならびにプローブは、転移性の表現型の獲得に関連する遺伝子を同定するために、親細胞株および改変体細胞株から作製され得る。このモデルは、いくつかの代替的なヒト結腸癌種細胞株 (SW480およびKM12Cを含む) を使用して確立され得る。

【0084】

本発明の方法において有用であり得るさらなる動物モデルは、本明細書中の実施例の節に記載される。

【0085】

別の局面において、本明細書中に記載される細胞ベースの系を使用して、腫瘍形成疾患症状およびアポトーシス疾患症状を緩和するように作用し得る化合物を同定し得る。例えば、このような細胞系は、曝露された細胞において腫瘍形成疾患症状およびアポトーシス疾患症状のこのような緩和を誘発するに十分な濃度および十分な時間で、腫瘍形成疾患症状およびアポトーシス疾患症状を緩和する能力を示すことが推測される化合物に曝露され得る。曝露後、これらの細胞は、腫瘍形成疾患またはアポトーシス疾患の細胞表現型の1つ以上が、より正常またはより野生型の、非腫瘍形成疾患または非アポトーシス疾患の表現型に類似するように変更されているか否かを決定するために、試験される。腫瘍形成疾患状態に関連する細胞表現型としては、異常な増殖および移動、新脈管形成、足場非依存性増殖ならびに接触障害の喪失が挙げられる。アポトーシス疾患状態に関連する細胞表現型としては、異常なDNAフラグメント化、膜小胞形成、カスパーゼ活性およびミトコンドリアからのシトクロムc放出が挙げられる。

10

【0086】

さらに、本明細書中に記載されるような動物ベースの腫瘍形成疾患系は、腫瘍形成疾患症状またはアポトーシス疾患症状を緩和し得る化合物を同定するために使用され得る。このような動物モデルは、腫瘍形成疾患またはアポトーシス疾患を処置する際に有効であり得る薬物、医薬、治療剤および介入の同定のための試験基質として使用され得る。例えば、動物モデルは、曝露された動物において腫瘍形成疾患症状およびアポトーシス疾患症状のこのような緩和を誘発するに十分な濃度および十分な時間で、腫瘍形成疾患症状およびアポトーシス疾患症状を緩和する能力を示すことが疑われる化合物に曝露され得る。曝露に対するこれらの動物の応答は、腫瘍形成疾患に関連する障害の逆転を評価することによって、例えば、処置の前後の腫瘍の数を計数すること、および／または腫瘍のサイズを測定することによって、モニタリングされ得る。さらに、これらの動物は、腫瘍形成疾患に関連する障害の逆転（例えば、処置前後の腫瘍荷重、腫瘍サイズ、ならびに浸潤能および／または転移能における減少）を評価することによって、モニタリングされ得る。

20

【0087】

本発明に関して、腫瘍形成疾患症状またはアポトーシス疾患症状の任意の局面を逆転する任意の処置は、ヒトの腫瘍形成疾患またはアポトーシス疾患の治療的介入についての候補とみなされるべきである。試験薬剤の投薬量は、用量応答曲線を誘導することによって決定され得る。

30

【0088】

さらに、遺伝子発現パターンは、化合物が心血管疾患症状または腫瘍形成疾患症状を緩和する能力を評価するために利用され得る。例えば、1つ以上の遺伝子の発現パターンは、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」（これらは、次いで、このような評価において使用され得る）の一部を形成し得る。本明細書中で使用される場合、「遺伝子発現プロファイル」または「転写プロファイル」は、所定のセットの条件下で所定の組織または細胞型について得られたmRNA発現のパターンを含む。このような条件としては、本明細書中に記載されるコントロール条件または実験条件（例えば、細胞周期に入るように誘導された同調細胞、またはRERモデルもしくはSmad4モデル）のいずれかを含む、腫瘍（例えば、乳房、結腸、卵巣または肺の腫瘍）の存在が挙げられ得るが、これに限定されない。他の条件としては、例えば、細胞分化、形質転換、転移および発癌物質曝露が挙げられ得る。遺伝子発現プロファイルは、例えば、ディファレンシャルディスプレイ手順、ノーザン分析および／またはRT-PCRを利用することによって、生成され得る。1実施形態において、25943遺伝子配列は、このような遺伝子発現プロファイルの生成および裏付けのために、プローブおよび／またはPCRプライマーとして使用され得る。

40

50

【0089】

遺伝子発現プロファイルは、細胞ベースのモデル系および／または動物ベースのモデル系内の、腫瘍形成疾患もしくはアポトーシス疾患または正常のいずれかである、既知の状態に対して特徴づけられ得る。続いて、これらの既知の遺伝子発現プロファイルは、このような遺伝子発現プロファイルを改変し、そしてより所望されるプロファイルとより密接に類似したプロファイルをもたらすという、試験化合物が有する効果を確認するために比較され得る。

【0090】

例えば、化合物の投与は、腫瘍形成疾患モデル系またはアポトーシス疾患モデル系の遺伝子発現プロファイルを、コントロール系とより密接に類似させ得る。あるいは、コントロール系の遺伝子発現プロファイルに、化合物の投与は、腫瘍形成疾患状態またはアポトーシス疾患状態を模倣し始めさせ得る。このような化合物は、例えば、目的の化合物をさらに特徴付ける際に使用され得るか、またはさらなる動物モデルの作出において使用され得る。

10

【0091】

(I I. 予測医学)

本発明はまた、予測医学の分野に関する。この分野において、診断アッセイ、予後アッセイ、およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）目的のために使用され、それによって個体を予防的に処置する。従って、本発明の1つの局面は、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、腹水、細胞または組織（例えば、乳房、肺、結腸または卵巣の組織））に関して、25943タンパク質および／または核酸の発現、ならびに25943活性を決定し、それによって、個体が、細胞増殖障害に罹患しているか否かを決定するための、診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が細胞増殖障害を発症する危険性があるか否かを決定するための、予後（または予測）アッセイを提供する。例えば、25943遺伝子における変異が、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後目的または予測目的のために使用され得、それによって個体は、細胞増殖障害の発症前に、予防的に処置される。

20

【0092】

本発明の別の局面は、臨床試験における、25943の発現または活性に対する25943調節因子（例えば、抗25943抗体または25943リボザイム）の影響のモニタリングに関する。

30

【0093】

これらおよび他の薬剤は、以下の節で、さらに詳細に記載される。

【0094】

(A. 細胞増殖障害についての診断アッセイ)

被験体が、細胞増殖障害に罹患しているか否かを決定するために、生物学的サンプルは被験体から獲得され得、そしてこの生物学的サンプルは、この生物学的サンプル中の25943タンパク質または25943タンパク質をコードする核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）を検出し得る化合物または薬剤と接触され得る。25943 mRNAまたはゲノムDNAを検出するのに好ましい薬剤は、25943 mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、配列番号1に示される25943核酸またはそれらの一部（例えば、少なくとも15、20、25、30、25、40、45、50、100、250または500ヌクレオチド長であり、ストリンジェントな条件下で、25943 mRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチド）であり得る。本発明の診断アッセイにおいて使用するのに適切な他のプローブが、本明細書中に記載されている。

40

【0095】

サンプル中の25943タンパク質を検出するのに好ましい薬剤は、25943タンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であり得、より好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。インタ

50

クトな抗体、またはそのフラグメント（例えば、F a bまたはF（a b'）₂）が、使用され得る。用語「標識」は、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をプローブまたは抗体に連結（すなわち、物理的に連結）することによるこのプローブまたは抗体の直接的な標識、ならびに直接的に標識された別の試薬との反応性によるこのプローブまたは抗体の間接的な標識を包含することが意図される。抗体または核酸プローブに結合体化され得る直接的な基質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るような、ビオチンでのDNAプローブの末端の標識の検出が挙げられる。

【0096】

用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞、および生物学的流体、ならびに被験体内に存在する組織、細胞、および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロおよびインビボで、生物学的サンプル中の25943 mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出し得る。例えば、25943 mRNAを検出するためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。25943のタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光検査法が挙げられる。25943のゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、25943のタンパク質を検出するためのインビボ技術としては、被験体への標識抗25943抗体の導入が挙げられる。例えば、抗体は、被験体における存在および位置が、標準的な画像化技術によって検出され得る放射活性マーカーを用いて、標識され得る。

【0097】

別の実施形態において、本方法はさらに、コントロール被験体からのコントロール生物学的サンプルを獲得する工程、コントロールサンプルと、25943タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤とを接触させる工程（その結果、25943タンパク質、mRNA、または核酸の存在が、生物学的サンプルにおいて検出される）、およびコントロールサンプル中の25943タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と、試験サンプル中の25943タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0098】

（B．細胞増殖障害についての予後アッセイ）

本発明はさらに、異常な25943発現または活性に関連する細胞増殖障害を発症する危険を有する被験体を同定するための方法に関する。

【0099】

本明細書中で使用される場合、用語「異常な」は、野生型の25943の発現または活性から逸脱した、25943の発現または活性を含む。異常な発現または活性としては、発現または活性の増加または減少、ならびに野生型の発現の発生的パターンまたは細胞下の発現のパターンに従わない、発現または活性が挙げられる。例えば、異常な25943の発現または活性は、25943遺伝子が、25943遺伝子における変異によって過少発現または過剰発現される状況、ならびにこのような変異によって、非機能的25943タンパク質または野生型の様式で機能しないタンパク質（例えば、25943基質と相互作用しないタンパク質、または非25943基質と相互作用するタンパク質）を生じる状況を含むことが意図される。

【0100】

本明細書中で記載されるアッセイ（例えば、上述の診断アッセイまたは後述のアッセイ）は、細胞増殖障害（例えば、乳癌、結腸癌、肺癌および／または卵巣癌）を有するかまたはそれを発症する危険を有する被験体を同定するために使用され得る。生物学的サンプルは、被験体から獲得され得、そして遺伝的変更の存在または非存在について試験され得る

10

20

30

40

50

。例えば、このような遺伝的変更は、以下の少なくとも1つの存在を確認することにより検出され得る：1) 25943遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；2) 25943遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；3) 25943遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、4) 25943遺伝子の染色体再構築；5) 25943遺伝子のメッセンジャーRNA転写物レベルの変更、6) ゲノムDNAのメチル化パターンのような、25943遺伝子の異常な改変、7) 25943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) 25943タンパク質の非野生型レベル、9) 25943遺伝子の対立遺伝子喪失、および10) 25943タンパク質の不適切な翻訳後修飾。

【0101】

本明細書中に記載されるように、25943遺伝子における遺伝的変更を検出するために使用され得る多くのアッセイが、当該分野において公知である。例えば、25943遺伝子の遺伝的変更は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）、あるいは、ライゲーション連鎖反応（LCR）（例えば、Landegranら（1988）*Science* 241:1077-1080；およびNakazawaら（1994）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364を参照のこと）におけるプローブ／プライマーを使用して検出され得、これらのうちの後者は、25943遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（Abravayaら（1995）*Nucleic Acids Res.* 23:675-682を参照のこと）。この方法は、被験体から生物学的サンプルを収集する工程、このサンプルから核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNAまたはこれらの両方）を単離する工程、（存在するならば）25943遺伝子のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、この核酸サンプルを、25943遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させる工程、ならびに増幅産物の存在または非存在を検出するかあるいは増幅産物のサイズを検出しそしてコントロールサンプルと長さを比較する工程を包含する。PCRおよび／またはLCRが、本明細書中に記載される変異を検出するために使用される任意の技術と組合わせて予備的増幅工程として使用するに好ましくあり得ることが、予測される。

【0102】

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

【0103】

代替の実施形態において、生物学的サンプル由来の25943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によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールDNAが、単離され、（必要に応じて）増幅され、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長サイズが、ゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズの差異は、サンプルDNA中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム（例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと）の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失によって、特定の変異の存在についてスコア付けするために使用され得る。

【0104】

他の実施形態において、25943中の遺伝的変異が、数百個または数千個のオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドプローブを含む高密度アレイ (Cronin, M. T. ら (1996) Hum. Mutat. 7: 244-255; Kozal, M. J. ら (1996) Nat. Med. 2: 753-759) に対して、生物学的サンプル由来の核酸およびコントロール核酸 (例えば、DNAまたはRNA) をハイブリダイズすることによって、同定され得る。例えば、25943における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら ((1996) (前出) に記載されるような光生成DNAプローブを含む2次元アレイ中で同定され得る。簡単にいうと、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイが、連続的な重複プローブの線形アレイを作成することによって配列間の塩基変化を同定するために、サンプル中およびコントロール中の長いDNAストレッチ全体にわたり走査するために使用され得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程の後、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さく、特定化されたプローブアレイを使用することによって、特定の変異の特徴付けを可能にする第2ハイブリダイゼーションアレイが続く。各変異アレイは、平行プローブセットから構成され、一方は、野生型遺伝子に相補的であり、そして他方は、変異遺伝子に相補的である。

10

【0105】

なお別の実施形態において、当該分野で公知である任意の種々の配列決定反応が、生物学的サンプル中の25943の配列を、対応する野生型(コントロール)配列と比較することによって、生物学的サンプル中の25943遺伝子の直接的な配列決定および変異の検出に使用され得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560またはSanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463により開発された技術に基づく反応が挙げられる。種々の自動化配列決定手順が、質量分析法による配列決定 (例えば、PCT国際公開番号WO94/16101; Cohenら (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127-162; およびGriffinら (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159を参照のこと) を含む診断アッセイ (Naevé, C. W. (1995) Biotechniques 19: 448-53) を行う場合に利用され得ることもまた、企図される。

20

【0106】

25943遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、RNA/RNA異種二重鎖またはRNA/DNA異種二重鎖中でミスマッチした塩基を検出するために切断剤からの保護が使用される方法が挙げられる (Myersら (1985) Science 230: 1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の分野の技術は、野生型25943配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルより得られた潜在変異RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成される異種二重鎖を提供することによって、開始する。この二本鎖二重鎖は、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するような二本鎖の一本鎖領域を切断する因子で処理される。例えば、ミスマッチ領域を酵素的に消化するために、RNA/DNA二重鎖はRNaseで処理され得、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理され得る。他の実施形態において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二本鎖のいずれかが、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスmiumで処理され、そして、ミスマッチ領域を消化するためにピペリジンで処理される。ミスマッチ領域の消化後、次いで、生じた物質が、変異部位を決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズで分けられる。例えば、Cottonら (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397およびSaleebaら (1992) Methods Enzymol. 217: 286-295を参照のこと。好ましい実施形態において、コントロールDNAまたはRNAが、検出のために標識され得る。

30

40

【0107】

さらに別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、細胞のサンプルより得られた25943 cDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二

50

本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質（「DNAミスマッチ修復」酵素と呼ばれる）を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する（Hsuら（1994）Carcinogenesis 15:1657-1662）。例示的实施形態に従って、25943配列（例えば、野生型の25943配列）に基づくプローブは、試験細胞からのcDNA産物または他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素で処理され、そして存在する場合、切断産物は、電気泳動的プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

【0108】

他の実施形態において、電気泳動的移動度の変更を使用して、25943遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォメーション多型（SSCP）を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動的移動度の差異を検出し得る（Oritaら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA:86:2766; Cotton（1993）Mutat. Res. 285:125-144およびHayashi（1992）Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79もまた参照のこと）。サンプルおよびコントロールの25943核酸の一本鎖DNAフラグメントは変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動的移動度において生じた変更は、単一の塩基変化の検出さえ可能にする。DNAフラグメントは、標識されたプローブで標識されても検出されてもよい。このアッセイの感度は、（DNAではなく）RNAを用いることにより増強され、ここで二次構造は、配列の変化により感受性である。好ましい実施形態において、目的の方法は、電気泳動的移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を利用する（Keenら（1991）Trends Genet 7:5）。

【0109】

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

【0110】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーが調製され得、ここで、公知の変異が中心におかれ、次いで、完全な一致が見出される場合にのみハイブリダイゼーションを可能にする条件下で標的DNAにハイブリダイズする（Saikiら（1986）Nature 324:163）；Saikiら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230）。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に結合しそして標識標的DNAとハイブリダイズする場合に、PCR増幅標的DNAまたは多くの種々の変異にハイブリダイズされる。

【0111】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と組み合わせて使用され得る。増幅に特異的なプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の変異を保有し得るか（その結果、増幅は、差示的ハイブリダイゼーションに依存する）（Gibbsら（1989）Nucleic Acids Res. 1

10

20

30

40

50

7 : 2 4 3 7 - 2 4 4 8)、または適切な条件下で、ミスマッチが、防がれ得るかまたはポリメラーゼ伸長を低減され得る場合、一方のプライマーの3'末端で目的の変異を保有し得る (Prossner (1993) Tibtech 11:238)。さらに、切断ベース検出を作製するために、変異領域中に新規の制限部位を導入することが、好ましくあり得る (Gaspariniら (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。特定の実施形態において、増幅のためにTaqリガーゼを使用して増幅が行われ得ることもまた、明らかである (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。このような場合に、連結は、5'配列の3'末端で完全なミスマッチが存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅の存在または非存在を探索することによって特定の部位で既知の変異の存在を検出し得る。

10

【0112】

さらに、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して、細胞増殖障害を効果的に処置するために、被験体が25943モジュレーター (例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸または低分子) を投与され得るか否かを、決定し得る。

【0113】

(C. 臨床試験の間の効果のモニタリング)

本発明はさらに、25943モジュレーター (例えば、本明細書中において同定された25943モジュレーター) の、細胞増殖障害の処置に対する有効性を決定するための方法を提供する。例えば、25943遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは25943活性のアプレギュレートにおいて、25943モジュレーターは、25943遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは25943活性のダウンレギュレートを示す被験体の臨床試験においてモニタリングされ得る。あるいは、25943遺伝子の発現減少、タンパク質レベル減少、あるいは25943活性のダウンレギュレートにおける25943モジュレーターの有効性は、25943遺伝子の発現増加、タンパク質レベル増加、あるいは25943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、25943遺伝子、および好ましくは、細胞増殖障害に関係付けられている他の遺伝子の発現または活性が、「読み出し」すなわち特定の細胞の表現型のマーカーとして使用され得る。

20

【0114】

例えば (限定のためではなく)、(例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される) 25943活性を調節する因子での処置によって細胞において調節される、25943を含む遺伝子が、同定され得る。よって、細胞増殖障害を罹患する被験体に対する25943活性を調節する因子の効果を (例えば、臨床試験において) 研究するために、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、25943および細胞増殖障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについて分析され得る。遺伝子発現レベル (例えば、遺伝子発現パターン) は、本明細書中に記載されるようなノーザンブロット分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載される方法の1つによって生成されるタンパク質の量を測定することによって、または25943または他の遺伝子の活性レベルを測定することによって、定量され得る。この方法において、遺伝子発現パターンは、25943活性を調節する因子に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとして働き得る。この応答状態は、個体を25943活性を調節する因子で処置する前、あるいはその間の種々の時点で測定され得る。

30

40

【0115】

好ましい実施形態において、本発明は、25943活性を調節する因子 (例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される低分子) での被験体の処置の有効性をモニタリングするための方法を提供し、以下の工程を包含する: (i) この因子の投与前に投与前サンプルを被験体から得る工程; (ii) この投与前サンプル中の25943のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルを検出する工程; (i

50

i i) 1つ以上の投与後サンプルを被験体から得る工程；(i v) これらの投与後サンプル中の25943タンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを検出する工程；(v) 投与前サンプル中の25943のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルを、投与後サンプル中の25943のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルと比較する工程；ならびに(v i) 被験体に対する因子の投与を然るべく変更する工程。例えば、因子の投与増加は、25943の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を増加させる）レベルよりも高いレベルに増加することが、好ましくあり得る。あるいは、因子の投与減少は、25943の発現または活性を、検出された（すなわち、因子の有効性を減少させる）レベルよりも低いレベルに減少することが、好ましくあり得る。この実施形態に従って、25943の発現または活性は、観察可能な表現型応答の非存在下ですら、因子の有効性の指標として使用され得る。

10

【0116】

(I I I . 細胞増殖障害に罹患している被験体の処置方法)

本発明は、細胞増殖障害（例えば、乳癌、卵巣癌、肺癌、および／または結腸癌）のリスクがある（またはこの障害に対して感受性である）被験体（例えば、ヒト）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、被験体の「処置」とは、疾患もしくは障害を有する被験体、疾患もしくは障害の症状を有する被験体、または疾患もしくは障害のリスクがある（その疾患もしくは障害に対して感受性である）被験体へかその被験体由来の細胞もしくは組織へ、その疾患もしくは障害、その疾患もしくは障害の症状、または疾患もしくは障害のリスク（その疾患もしくは障害に対する感受性）を治療、治癒、緩和、軽減、変更、矯正、改良、改善または影響する目的で、治療剤を適用または投与することを包含する。本明細書中で使用される場合、「治療剤」としては、低分子、ペプチド、ポリペプチド、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。

20

【0117】

処置の予防法および治療法の両方の観点で、このような処置は、ゲノム薬理学（pharmacogenomics）の分野から得られる知識に基いて、特異的に仕立てられる（tailored）かまたは改変され得る。本明細書中で使用される場合、「ゲノム薬理学」は、遺伝子配列決定、統計的遺伝学および遺伝子発現分析のようなゲノム技術の、臨床開発および市場での薬物に対する適用をいう。より詳細には、この用語は、患者の遺伝子がどのように薬物に対する患者の応答（例えば、患者の「薬物応答表現型」または「薬物応答遺伝子型」）を決定するののかについての研究をいう。

30

【0118】

よって、本発明の別の局面は、個体の薬物応答遺伝子型に従って、本発明の25943分子または25943調節因子のいずれかを用いるその被験体の予防処置または治療処置を仕立てるための方法を提供する。ゲノム薬理学によって、臨床医（clinician）または内科医（physician）は、この処置から最も利益を得る患者に対して予防処置または治療処置を標的化することが可能になり、そして毒性薬物関連副作用を被る患者の処置を避けることが可能になる。

40

【0119】

(A. 予防法)

1つの局面において、本発明は、25943発現もしくは25943活性を調節する因子（例えば、乳房細胞、肺細胞、結腸細胞、または卵巣細胞における、例えば、細胞増殖の調節）を被験体に投与することによって、その被験体において細胞増殖障害を予防するための方法を提供する。細胞増殖障害のリスクがある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはその組み合わせによって、同定され得る。予防薬の投与は、異常な25943の発現または活性が特徴的な症状の徴候の前に生じ得、その結果、細胞増殖障害が、予防されるか、またはその進行において遅延される。25943異常の型に依存して、例えば、25943分子、25943のアゴニスト

50

剤または25943のアンタゴニスト剤が、被験体の処置のために使用され得る。適切な因子は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基いて決定され得る。

【0120】

(B. 治療方法)

本発明の別の局面は、細胞増殖障害に罹患した被験体を処置するための方法に関する。これらの方法は、25943の発現または活性を調節する因子（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り同定される因子）、またはこのような因子の組み合わせを、被験体に投与することを包含する。別の実施形態では、この方法は、低下した、異常な、または望ましくない、25943の発現または活性を補償するための治療として、25943のタンパク質または核酸分子を、被験体に投与することを包含する。

10

【0121】

25943活性の刺激は、25943が異常にダウンレギュレートされる状況、そして／あるいは増加した25943の活性が、有益な効果（すなわち、細胞増殖の増加）を有し、それにより被験体における細胞増殖障害（例えば、神経変性障害）を軽減すると考えられる状況において好適である。同様に、25943活性の阻害は、25943が、異常にアップレギュレートされる状況、そして／あるいは減少した25943活性が、有益な効果（すなわち、細胞増殖の減少）を有し、それにより、被験体における細胞増殖障害（例えば、乳癌、卵巣癌、肺癌、または結腸癌）を軽減すると考えられる状況において好適である。

【0122】

25943の活性を調節する因子は、このような投与に適切な薬学的組成物を用いて、被験体に投与され得る。このような組成物は、代表的には、因子（例えば、核酸分子、タンパク質、または抗体）および薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的投与に適合性の、任意および全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌性および抗真菌性の薬剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。このような媒体および薬剤の、薬学的に活性な物質のための使用は、当該分野で周知である。活性な化合物と非適合性の任意の従来の媒体または薬剤の範囲を除いて、このような媒体の本発明の組成物における使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、この組成物に組み込まれ得る。

20

【0123】

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

30

40

【0124】

注射用途に適切な薬学的組成物は、滅菌注射溶液または分散液の即時調製物のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および滅菌粉末を含む。静脈内投与については、適切なキャリアには、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（BASF; Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、この組成物は、滅菌されなければならない、そして容易なシリンジ能力（syringability）が存在する程度にまで流動的にされるべきで

50

ある。これは製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の汚染作用に対して保存されなければならない。このキャリアは、溶媒または分散媒体（例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）を含む）、ならびにそれらの安定な混合物であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール、ソルビトール）、および塩化ナトリウム）をこの組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の延長した吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）をこの組成物中に含むことによって、もたらされ得る。

10

【0125】

滅菌注射用溶液は、25943活性を調節する因子（例えば、25943タンパク質のフラグメント、あるいは抗25943抗体）を、上記で列挙した成分の1以上の組合せを用いて、必要とされる量で、適切な溶媒中に取り込ませ、必要に応じて、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化化合物を、塩基性分散媒体および上記に列挙された成分のうちの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に取り込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、減圧乾燥および凍結乾燥であり、これらは、予め滅菌濾過された溶液から活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる。

20

【0126】

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

30

【0127】

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

40

【0128】

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

【0129】

50

25943 活性を調節する薬剤もまた、（例えば、カカオ脂および他のグリセリドのような、従来の坐剤基剤を用いて）坐剤の形態で調製され得るか、または経直腸送達のために保持浣腸の形態で調製され得る。

【0130】

1つの実施形態において、25943 活性を調節する薬剤は、その化合物が身体から迅速に排出されるのを防ぐキャリアを用いて調製される（例えば、移植物および微小カプセル化送達システムを含む、徐放性処方物）。生分解性の生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）が、使用され得る。そのような処方物の調製方法は、当業者にとって明らかである。それらの物質はまた、Alza Corporation および Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染細胞標的化リポソームを含む）もまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

10

【0131】

投与の容易さおよび投与量の均一さのために、単位投与形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有利である。本明細書中で使用される場合、単位投与形態とは、処置される被験体にとっての単位投与量として適切な、物理的に別個の単位を指す；各単位は、必要な薬学的キャリアに付随した状態で、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。本発明の単位投与形態についての説明は、25943 活性を調節する薬剤の独特の特徴、ならびに達成されるべき特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためにそのような薬剤を配合する分野に固有の制限により決定され、直接依存する。

20

【0132】

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

30

【0133】

細胞培養アッセイおよび動物実験から得られるデータは、ヒトにおける使用のために一定範囲の投与量を処方する際に使用され得る。そのような25943 調節薬剤の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど伴わないかまたは全く伴わない、ED50を含む一定範囲の循環濃度内に存在する。その投与量は、使用される投与形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変動し得る。本発明の治療方法において使用されるどの薬剤についても、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイからまず推定され得る。細胞培養において決定されるようなIC50（すなわち、症状の最大阻害半分を達成する試験化合物濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて処方され得る。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために、使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

40

【0134】

本明細書中で規定される場合、タンパク質またはポリペプチドの治療上有効な量（すなわち、有効投与量）は、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは、約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは、約0.1~20mg/kg体重、およびなおより好ましくは、約1~10mg/kg体重、2~9mg/kg体重、3~8mg/kg体重、4~7mg/kg体重、または5~6mg/kg体重の範囲である。特定の要因が、被験

50

体を有効に処置するために必要な投与量に影響し得ることを当業者は認識し、そのような要因としては、疾患もしくは障害の重篤度、以前の処置、被験体の全身の健康および／または年齢、ならびに存在する他の疾患が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、治療上有効な量のタンパク質、ポリペプチド、または抗体を用いる被験体の処置は、単回処置を包含し得、好ましくは、一連の処置を包含し得る。

【0135】

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

10

【0136】

本発明は、発現または活性を調節する薬剤を包含する。薬剤は、例えば、低分子であり得る。例えば、そのような低分子としては、ペプチド、ペプチド模倣物、アミノ酸、アミノ酸アナログ、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドアナログ、ヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、約10,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約1,000グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、約500グラム/モル未満の分子量を有する有機化合物もしくは無機化合物、ならびにそのような化合物の塩、エステル、および他の薬学的に受容可能な形態が挙げられるが、これらに限定されない。低分子薬剤の適切な用量は、当業者である医師、獣医師、または研究者の知識内にある多数の要因に依存することが理解される。この低分子の用量は、例えば、処置される被験体またはサンプルの身元、サイズおよび状態に依存して変化し、さらに、該当する場合は、その組成物が投与される経路、ならびに本発明の核酸もしくはポリペプチドに対してその低分子が有することを実施者が望む効果に依存して変化する。

20

【0137】

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

30

40

【0138】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、治療部分（例えば、サイトトキシン）、治療剤、または放射性金属イオンに結合体化され得る。サイトトキシンまたは細胞傷害性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を包含する。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、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、ミトキサントロン、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

50

イン、リドカイン、プロパロノール、およびピューロマイシン、ならびにそれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、ダカルバジン（decarbazine）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、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cis-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（前名ダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（前名アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

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

【0140】

そのような治療部分を抗体に結合体化するための技術は、周知である。例えば、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeldら編（Alan R. Liss, Inc., 1985）、pp. 243~56のArnonら、「Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy」；Controlled Drug Delivery（第2版）、Robinsonら編（Marcel Dekker, Inc., 1987）pp. 623~53のHellstromら「Antibodies for Drug Delivery」；Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pincheraら編, pp. 475~506（1985）のThorpe, 「Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review」；Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwinら編（Academic Press 1985）pp. 303~16の「Analysis, Results, And Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」；ならびにThorpeら（1982）「The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates」, Immunol. Rev. 62:119~58を参照のこと。あるいは、抗体は、Segalによって米国特許第4,676,980号中に記載されるように、抗体ヘテロ結合体を形成するために二次抗体と結合体化され得る。

【0141】

本発明の方法において使用される核酸分子は、ベクター中に挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与

(米国特許第5, 328, 470号を参照のこと) または定位注射 (例えば、Chenら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054~3057を参照のこと) によって、被験体に送達され得る。その遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中に遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれた徐放マトリクスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクター (例えば、レトロウイルスベクター) が組換え細胞からインタクトで産生され得る場合、その薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

【0142】

(C. 薬理ゲノム学 (pharmacogenomics))

本発明の治療法と組み合わせて、薬理ゲノム学 (すなわち、被験体の遺伝子型と、外来化合物または外来薬物に対するその被験体の応答との間の関連性の研究) が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理学的に活性な薬物の用量と血液濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗をもたらし得る。従って、医師または臨床医は、25943活性を調節する薬剤を投与するか否か、ならびに25943活性を調節する薬剤を用いる処置の投与量および／もしくは治療レジメンを変更するか否かを決定する際に、適切な薬理ゲノム学研究において得られる知識を適用することを考慮し得る。

【0143】

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

【0144】

「ゲノムワイド相関解析 (genome-wide association)」として知られている、薬物応答を予測する遺伝子を同定するための1つの薬理ゲノム学的アプローチは、すでに知られている遺伝子関連マーカー (例えば、「二座対立遺伝子」マーカーマップ (これは、ヒトゲノム上の60, 000~100, 000の多型部位または変動部位からなり、その部位の各々は、2つの改変体を有する)) からなるヒトゲノムの高分離度マップに、主に依存する。このような高分離度ゲノムマップは、特定の観察された薬物応答または副作用に関連したマーカーを同定するために、フェーズII/フェーズIIIの薬物試験に参加した統計学的に有意な数の患者の各々のゲノムのマップと比較され得る。あるいは、このような高分離度マップは、ヒトゲノムにおいて、数千万個の公知の単一ヌクレオチド多型 (SNP) の組み合わせから生じ得る。本明細書中で使用される場合、「SNP」とは、DNAストレッチにおいて、単一のヌクレオチド塩基において生じる一般的な変化である。例えば、SNPは、1000塩基のDNAごとに1回生じ得る。SNPは、疾患プロセスに関与し得るが、大部分は、疾患に関連していないかもしれない。このようなSNPの発生に基づく遺伝地図を考慮すると、個体は、個々のゲノムにおける特定のSNPパターンに依存して、複数の遺伝カテゴリーへと分類され得る。このような様式において、処置レジメンは、遺伝的に類似する個体の間で共通であり得る形質を考慮して、そのような遺伝的に類似する個体の群に合わせて変更され得る。

【0145】

あるいは、「候補遺伝子アプローチ」と呼ばれる方法が、薬物応答を予測する遺伝子を同定するために用いられ得る。この方法に従って、薬物標的をコードする遺伝子が既知である場合（例えば、本発明の25943タンパク質）、その遺伝子のすべての一般的な改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョンを有することが特定の薬物応答に関連するか否かが決定され得る。

【0146】

例示的实施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続時間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）およびシトクロムP450酵素であるCYP2D6およびCYP2C19）の遺伝子多型の発見は、標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に、予測される薬物効果を得ることも過大な薬物応答および重篤な毒性を示すこともない患者が存在する理由に関する説明を提供した。これらの多型は、その集団中で2つの表現型（代謝が速い者（EM）および代謝が遅い者（PM））の状態で発現される。PMの普及率は、種々の集団間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は、非常に多型性であり、いくつかの変異が、PMにおいて同定されており、そのすべてが、機能的CYP2D6の不在をもたらす。CYP2D6およびCYP2C19の代謝速度が遅い者は、標準的用量を受けたときに、過大な薬物応答および副作用を非常に頻繁に経験する。代謝物が活性な治療部分である場合、PMは、CYP2D6が形成した代謝物であるモルヒネにより媒介されるコデインの鎮痛効果について示されるように、治療応答を示さない。その他の極端な者は、標準的用量に対して応答しない、いわゆる代謝が著しく速い者である。最近、著しく速い代謝の分子的基礎が、CYP2D6遺伝子増幅に起因することが同定された。

【0147】

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25943分子または25943モジュレーター）を投薬された動物の遺伝子発現は、毒性に関連する遺伝子経路が作動するかどうかの指標を与え得る。

【0148】

上記薬理ゲノム学的アプローチのうちの1つより多くから得られる情報が、被験体の予防的処置または治療的処置のための、適切な投薬量および処置レジメンを決定するために使用され得る。この知識は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、それによって、25943活性を調節する薬剤を用いて細胞増殖障害に罹患している被験体を処置する場合、治療効果または予防効果を増強し得る。

【0149】

（IV．本発明の方法において使用される、組換え発現ベクターおよび宿主細胞）
本発明の方法（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイ）は、25943タンパク質（またはその一部）をコードする核酸を含むベクター（好ましくは発現ベクター）の使用を包含する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」とは、連結された別の核酸を輸送し得る、核酸分子を指す。1つの型のベクターは、「プラスミド」であり、「プラスミド」とは、さらなるDNAセグメントが連結され得る、環状の二本鎖DNAの輪を指す。別の型のベクターは、ウイルスベクターであり、そのベクターにおいて、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノム中に連結され得る。特定のベクターは、導入される宿主細胞中で自律複製可能である（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソード性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中に導入された際に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって、その宿主ゲノムとともに複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指向し得る。そのようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」とは、互換可能に使用され得る。なぜなら、プラスミドは、ベクターの最も一般的に使用され

る形態であるからである。しかし、本発明は、等価な機能を提供する、そのような他の形態の発現ベクター（例えば、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス））を包含することが意図される。

【0150】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞中での核酸の発現に適切な形態で発明の核酸を含む。このことは、その組換え発現ベクターが、発現されるべき核酸配列に作動可能に連結された1つ以上の調節配列（発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される）を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロでの転写／翻訳系において、またはそのベクターが宿主細胞中に導入される場合は、その宿主細胞において）そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味することが意図される。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような調節配列は、例えば、Goeddel（1990）Methods Enzymol. 185: 3～7に記載される。調節配列とは、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞においてのみそのヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）を包含する。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者により認識される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞内に導入され得、それにより本明細書中に記載されるような核酸によってコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、25943タンパク質、25943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。

【0151】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における25943タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、25943タンパク質は、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用する）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel（1990）前出においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0152】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを使用して、E. coliにおいて最も頻繁に行われる。融合ベクターは、ベクター中にコードされるタンパク質に、通常は、組換えタンパク質のアミノ末端に、多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、3つの目的を果たす：1）組換えタンパク質の発現を増大させること；2）組換えタンパク質の可溶性を増大させること；および3）アフィニティー精製におけるリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性切断部位は、融合部分と組換えタンパク質の接合部に導入され、融合タンパク質の精製に続いて、組換えタンパク質を融合部分から分離することが可能になる。このような酵素、およびそれらの同族認識配列は、第Xa因子、トロンビンおよびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、標的組換えタンパク質に融合させる、pGEX（Pharmacia Biotech Inc；Smith, D. B. およびJohnson, K. S.（1988）Gene 67: 31-40）、pMAL（New England Biolabs, Beverly, MA）およびpRIT5（Pharmacia, Piscataway, NJ）が挙げられる。

【0153】

10

20

30

40

50

精製融合タンパク質は、25943 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25943 タンパク質に特異的な抗体を生成するために利用され得る。好ましい実施形態において、本発明のレトロウイルス発現ベクターにおいて発現される25943 融合タンパク質は、骨髄細胞に感染させるために利用され得る。続いて、この骨髄細胞は、照射されたレシピエントに移植される。次いで、被験体レシピエントの病態は、十分な時間（例えば、6週間）が経過した後に試験される。

【0154】

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

10

20

【0155】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型においてこの核酸の発現を優先的に指向し得る（例えば、組織特異的調節エレメントがこの核酸を発現させるために使用される）。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。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）、特に、T細胞レセプター（Winoto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) のプロモーター、神経特異的プロモーター（例えば、神経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）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開番号264,166）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた包含される（例えば、マウスhoxプロモーター（KesselおよびGruss (1990) Science 249:374-379）ならびにα-フェトプロテインプロモーター（CampesおよびTilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546）。

30

40

【0156】

本発明の方法は、本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクター（このDNA分子は、この発現ベクターにアンチセンス方向にてクローニングされる）をさらに使用し得る。すなわち、このDNA分子は、25943 mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の（このDNA分子の転写による）発現を可能にする様式にて、調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的発現を指向する、アンチセンス方向にクローニングされる核酸に作動可能に連結される調節配列（例えば、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサー）が選択され得るか、またはアンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。このアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、また

50

は弱毒化ウイルスの形態であり得、この中でアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で生成され、その活性は、ベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraub, H. ら, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1 (1) 1986を参照のこと。

【0157】

本発明の別の局面は、本発明の25943核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の25943核酸分子または宿主細胞のゲノムの特定の部位への相同組み換えを可能にする配列を含む25943核酸分子）が導入される宿主細胞の使用に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で交換可能に使用される。このような用語が、特定の被験体細胞のみならず、このような細胞の子孫または潜在的な子孫もまたいうことが理解される。特定の改変が、変異または環境的影響のいずれかに起因して、連続した世代において生じ得るので、このような子孫は、実際に、親細胞と同じでなくてもよいが、なお本明細書中で使用される用語の範囲内に含まれる。

【0158】

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、25943タンパク質は、細菌細胞（例えば、E. coli、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0159】

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

【0160】

本発明の方法において使用される宿主細胞（例えば、培養中の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞）は、25943タンパク質を産生する（すなわち、発現する）ために用いられ得る。従って、本発明は、さらに本発明の宿主細胞を用いて25943タンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態では、この方法は、本発明の宿主細胞（25943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、25943タンパク質が産生されるような適切な培地中で培養する工程を包含する。別の実施形態では、本方法は、培地または宿主細胞から25943タンパク質を単離する工程をさらに包含する。

【0161】

（V. 本発明の方法において使用される単離された核酸分子）
単離されたヒト25943遺伝子のcDNA配列およびヒト25943ポリペプチドの推定アミノ酸配列を、それぞれ配列番号1および2に示す。配列番号3として示す配列番号1のヌクレオチド123～1046は、25943コード領域を包含する。

【0162】

本発明の方法は、25943タンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、ならびに25943をコードする核酸分子（例えば、25943 mRNA）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に足りる核酸フ

ラグメント、および25943核酸分子を増幅または変異するためのPCRプライマーとしての使用のためのフラグメントの使用を、包含する。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）およびRNA分子（例えば、mRNA）、ならびにヌクレオチドアナログを使用して生成されるDNAアナログまたはRNAアナログを含むことが意図される。この核酸分子は一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0163】

本発明の方法において使用される核酸分子（例えば、配列番号1またはその一部のヌクレオチド配列を有する核酸分子）を、標準的な分子生物学的技術および本明細書中に提供される配列情報を使用して単離し得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1の核酸配列の全部または一部を使用して、25943核酸分子を、（例えば、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されるような）標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術を使用して単離し得る。 10

【0164】

さらに、配列番号1の全部または一部を含有する核酸分子を、配列番号1の配列に基づいて設計した合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、単離し得る。 20

【0165】

本発明の方法において使用される核酸を、標準的なPCR増幅技術に従って、テンプレートとしてのcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅し得る。さらに、25943ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを、標準的な合成技術（例えば、自動DNA合成機を使用すること）によって、調製し得る。

【0166】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列、配列番号に示されるヌクレオチド配列の相補体、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の部分を含む。配列番号1に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子とは、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的である核酸分子であり、その結果、この核酸分子は配列番号1に示されるヌクレオチド配列にハイブリダイズし得、それによって安定な二重鎖を形成する。 30

【0167】

なお別の好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の全長、またはこの核酸配列の任意の部分に、少なくとも約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約81%、約82%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約99.1%、約99.2%、約99.3%、約99.4%、約99.5%、約99.6%、約99.7%、約99.8%、約99.9%以上同一であるヌクレオチド配列を含有する。 40

【0168】

さらに、本発明の方法において使用される核酸分子は、配列番号1の核酸配列の部分（例えば、プローブもしくはプライマーとして使用され得るフラグメント）、または25943タンパク質の部分（例えば、25943タンパク質の生物学的に活性な部分）をコードするフラグメント）のみを含み得る。代表的に、プローブ／プライマーは、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。代表的に、オリゴヌクレオチドは、配列番号1のセンス配列または配列番号1のアンチセンス配列、あるいは配列番号1の天然に存在する対立遺伝子の改変体または変異体の少なくとも約12または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65または75個連 50

続したヌクレオチドに、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の領域を含む。1つの実施形態において、本発明の方法において使用される核酸分子は、50、100、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350以上のヌクレオチド長よりも長く、かつ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の核酸分子にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

【0169】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」は、互いに有意に同一または相同であるヌクレオチド配列が、互いにハイブリダイズされたままである状態でハイブリダイゼーションおよび洗浄するための条件を記載することを意図する。好ましくは、この条件は、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、なおより好ましくは少なくとも約85%または90%で、互いに同一な配列が、互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。このようなストリンジェントな条件は、当業者に公知であり、そしてCurrent Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc. (1995), 2節, 4節および6節に見出され得る。さらなるストリンジェントな条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), 7節、9節および11節に見出され得る。好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約65~70℃での、4×または6×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム (SSC) 中でハイブリダイゼーション (または約42~50℃での、4×SSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約65℃~70℃での、1×SSCで1回以上の洗浄が挙げられる。さらに好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、45℃にて6×SSCでのハイブリダイゼーション、次いで約65℃にて0.2×SSC、0.1% SDSでの1回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約65~70℃での、1×SSC中でハイブリダイゼーション (または約42~50℃での、1×SSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約65℃~70℃での、0.3×SSCで1回以上の洗浄が挙げられる。好ましい、低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、約50~60℃での、4×または6×SSC中でハイブリダイゼーション (または代わりに約40~45℃での、6×SSC+50%ホルムアミド中でハイブリダイゼーション)、次いで約50℃~60℃での、2×SSCで1回以上の洗浄が挙げられる。上記の値の中間の範囲 (例えば、65~70℃または42~50℃) もまた、本発明に含まれることが意図される。SSPE (1×SSPEは、0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄ および1.25mM EDTA、pH 7.4である) は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液中でSSC (1×SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウムである) に置き換わり得る；洗浄は、各ハイブリダイゼーションが終了した後で、15分間実行される。50塩基対長未満であることが予測されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) より5~10℃低くあるべきであり、ここでT_m が以下の式に従って決定される。18塩基対長未満であるハイブリッドについて、T_m (℃) = 2 (A+T塩基の数) + 4 (G+C塩基の数)。18塩基対長と49塩基対長の間であるハイブリッドについて、T_m (℃) = 81.5 + 16.6 (log₁₀ [Na⁺]) + 0.41 (%G+C) - (600/N)、ここで、Nはハイブリッド中の塩基の数であり、そして[Na⁺] は、ハイブリダイゼーション緩衝液中のナトリウムイオンの濃度である (1×SSCについての[Na⁺] = 0.165M)。膜 (例えば、ニトロセルロース膜、またはナイロン膜) への核酸分子の非特異的ハイブリダイゼーションを減少させるために、さらなる試薬が、ハイブリダイゼーション緩衝液およ

び／または洗浄緩衝液に添加され得ることが当業者によってまた認識され、この試薬としては、限定されないが以下が挙げられる：ブロッキング剤（例えば、BSA、もしくはサケまたはニシンの精子キャリアDNA）、界面活性剤（例えば、SDS）、キレート剤（例えば、EDTA）、Ficoll、PVPなど。ナイロン膜が使用される場合、特にさらなる好ましい、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例としては、65℃での、0.25～0.5M NaH_2PO_4 、7% SDS中でハイブリダイゼーション、次いで65℃での、0.02M NaH_2PO_4 、1% SDSで1回以上の洗浄である（例えば、ChurchおよびGilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995, (または代替的に0.2×SSC、1% SDS)。

10

【0170】

好ましい実施形態において、プローブは、プローブに結合される標識基をさらに含む（例えば、標識基は、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素または酵素補因子であり得る）。このようなプローブは、25943タンパク質を誤発現する（misexpress）細胞または組織を同定するための診断的試験キットの一部として使用され得る（例えば、被験体由来の細胞サンプル中の25943コード核酸のレベルを測定すること、例えば、25943 mRNAレベルを検出するか、またはゲノム25943遺伝子に変異されているか欠失されているか否かを測定することによって）。

【0171】

本発明の方法は、遺伝暗号の縮重に起因して、配列番号1に示されるヌクレオチド配列とは異なり従って、配列番号1に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じ25943タンパク質をコードする核酸分子の使用をさらに含む。別の実施形態において、本発明の方法に含まれる単離された核酸分子は、配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

20

【0172】

本発明の方法は、ヒト25943の対立遺伝子改変体（例えば、機能的対立遺伝子改変体および非機能的対立遺伝子改変体）の使用をさらに含む。機能的対立遺伝子改変体は、ヒト25943タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体であって、25943活性を維持するアミノ酸配列改変体である。機能的対立遺伝子改変体は、代表的に、配列番号2の1つ以上のアミノ酸の保存的置換、またはそのタンパク質の非必須領域における非必須残基の置換、欠失、もしくは挿入のみを含む。非機能的対立遺伝子改変体は、ヒト25943タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体であって、25943活性を有さないアミノ酸配列改変体である。非機能的対立遺伝子改変体は、代表的には、配列番号2のアミノ酸配列の非保存的な置換、欠失、もしくは挿入または未成熟短縮化（premature truncation）、あるいはこのタンパク質の必須残基または必須領域の置換、挿入、または欠失を含む。

30

【0173】

本発明の方法は、ヒト25943タンパク質の非ヒトオルソログをさらに使用し得る。ヒト25943タンパク質のオルソログは、非ヒト生物から単離され、そして同じ25943活性を有するタンパク質である。

40

【0174】

本発明の方法は、配列番号1のヌクレオチド配列またはそれらの一部を含む核酸分子であって、変異が導入されている核酸分子の使用をさらに包含する。変異は、「非必須」アミノ酸残基または「必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導き得る。「非必須」アミノ酸残基とは、その生物学的活性を変化することなく25943の野生型配列（例えば、配列番号2の配列）から変化され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性のために必要とされる。例えば、本発明の25943タンパク質およびグリコシルアスパラギナーゼファミリーの他のメンバーの間で保存されたアミノ酸残基は、変化を受容する可能性は低い。

【0175】

50

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）により配列番号1に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1つ以上の予想される非必須アミノ酸残基でなされる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該分野において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 β -分枝鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、好ましくは、25943タンパク質において予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリーからの別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態において、変異は、例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって、25943のコード配列の全てまたは一部に沿って、ランダムに導入され得、そして得られた変異体は、活性を保持する変異体を同定するために、25943の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号1の変異誘発の後、コードされたタンパク質が、組換え発現され得、そしてそのタンパク質の活性が、本明細書中に規定されたアッセイを用いて決定され得る。

10

20

【0176】

本発明の別の局面は、配列番号1のヌクレオチド配列に対するアンチセンスである単離された核酸分子の使用に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である）ヌクレオチド配列を含む。従って、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合し得る。アンチセンス核酸は、全長25943コード鎖または、それらの一部のみに相補的であり得る。1実施形態において、アンチセンス核酸分子は、25943をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域をいう。別の実施形態において、このアンチセンス核酸分子は、25943をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対するアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する5'配列および3'配列であって、アミノ酸に翻訳されない配列をいう（5'および3'の非翻訳領域ともいう）。

30

【0177】

本明細書中に開示される25943をコードするコード鎖配列を考慮して、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickの塩基対形成の法則に従って、設計され得る。アンチセンス核酸分子は、25943mRNAの全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、25943mRNA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、25943mRNAの翻訳開始部位の周辺領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を使用して、化学的合成および酵素的連結反応を使用して構築され得る。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチド、あるいは分子の生物学的安定性を増大するように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間に形成される二重鎖の物理的安定性を増大するように設計された、種々に改変されたヌクレオチドを使用して、化学的に合成され得る。例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが使用され得る。アンチセンス核酸を生成するために使用され得る改変ヌクレオチドの例としては、以下が挙げられる：5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒ

40

50

ポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)wおよび2, 6-ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクロニングされた発現ベクターを使用して、生物学的に生成され得る(すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAは、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向のRNAであり、以下の下位の節においてさらに記載される)。

10

【0178】

本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸分子は、代表的に、被験体に投与されるかまたはインサイチュで産生され、その結果、これらは、25943タンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAにハイブリダイズするかまたは結合して、それによって、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によって、または、例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝における特異的な相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子を改変して、選択された細胞を標的化し、次いで、全身に投与し得る。例えば、全身投与に関して、アンチセンス分子は、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が、強力なpol IIプロモーターまたはpol III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。

20

30

【0179】

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

40

【0180】

なお別の実施形態において、本発明の方法に使用されるアンチセンス核酸は、リボザイムである。リボザイムは、これらのリボザイムが相補的領域を有する、一本鎖核酸(例えば、mRNA)を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(HaselhoffおよびGer

50

l a c h (1 9 8 8) N a t u r e 3 3 4 : 5 8 5 - 5 9 1 に記載される)) は、2 5 9 4 3 m R N A 転写物を触媒的に切断するために使用されて、それによって、2 5 9 4 3 m R N A の翻訳を阻害し得る。2 5 9 4 3 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2 5 9 4 3 c D N A (すなわち、配列番号1) のヌクレオチド配列に基づいて設計され得る。例えば、T e t r a h y m e n a L - 1 9 I V S R N A の誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が2 5 9 4 3 コードm R N A 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、C e c h ら、米国特許第4, 9 8 7, 0 7 1 号; およびC e c h ら、米国特許第5, 1 1 6, 7 4 2 号を参照のこと。あるいは、2 5 9 4 3 m R N A を使用して、R N A 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R N A を選択し得る。例えば、B a r t e l , D . およびS z o s t a k , J . W . (1 9 9 3) S c i e n c e 2 6 1 : 1 4 1 1 - 1 4 1 8 を参照のこと。 10

【0181】

あるいは、2 5 9 4 3 遺伝子の発現は、標的細胞中で2 5 9 4 3 遺伝子の転写を防止する三重ヘリックス構造を形成するために、2 5 9 4 3 の調節領域(例えば、2 5 9 4 3 のプロモーターまたはエンハンサー)に相補的なヌクレオチド配列を標的化することによって阻害され得る。一般に、H e l e n e , C . (1 9 9 1) A n t i c a n c e r D r u g D e s . 6 (6) : 5 6 9 - 8 4 ; H e l e n e , C . (1 9 9 2) A n n . N . Y . A c a d . S c i . 6 6 0 : 2 7 - 3 6 ; およびM a h e r , L . J . (1 9 9 2) B i o a s s a y s 1 4 (1 2) : 8 0 7 - 1 5 を参照のこと。 20

【0182】

なお別の実施形態において、本発明の方法において使用される2 5 9 4 3 核酸分子は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格において改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースリン酸骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る(H y r u p B . およびN i e l s e n P . E . (1 9 9 6) B i o o r g . M e d . C h e m . 4 (1) : 5 - 2 3 を参照のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」すなわち「P N A」は、核酸模倣物(例えば、D N A 模倣物)をいい、ここで、デオキシリボースリン酸骨格は、偽ペプチド骨格によって置換され、そして4 種の天然の核酸塩基だけが維持される。P N A の天然の骨格は、低イオン強度の条件下で、D N A およびR N A への特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。P N A オリゴマーの合成は、標準的な固相ペプチド合成プロトコルを使用して、H y r u p B . およびN i e l s e n (1 9 9 6) 前出ならびにP e r r y - O ' K e e f e r , (1 9 9 6) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 : 1 4 6 7 0 - 6 7 5 に記載されるように実施され得る。 30

【0183】

2 5 9 4 3 核酸分子のP N A は、本明細書中に記載される治療適用および診断適用において使用され得る。例えば、P N A は、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導するか、または複製を阻害することによって、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンス因子またはアンチ遺伝子(a n t i g e n e) 因子として使用され得る。2 5 9 4 3 核酸分子のP N A はまた、遺伝子中の単一塩基対の変異の分析において(例えば、P N A 指向性のP C R クランピングによって); 他の酵素と組み合わせて使用する場合には、「人工制限酵素」として(例えば、S 1 ヌクレアーゼ(H y r u p およびN i e l s e n , (1 9 9 6) 前出)); またはD N A 配列決定もしくはハイブリダイゼーションのためのプローブもしくはプライマーとして(H y r u p およびN i e l s e n , (1 9 9 6) 前出; P e r r y - O ' K e e f e r , (1 9 9 6) 前出)、使用され得る。 40

【0184】

別の実施形態において、2 5 9 4 3 のP N A は、(例えば、P N A の安定性または細胞取り込みを増強するために)、P N A に親油性もしくは他のヘルパー基を結合させることによってか、P N A - D N A キメラの形成によってか、またはリポソームもしくは当該分野 50

で公知の他の薬物送達技術の使用によって、改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせ得る25943核酸分子のPNA-DNAキメラが、生成され得る。このようなキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNAse HおよびDNAポリメラーゼ）に、DNA部分と相互作用させ、一方、PNA部分は、高い結合親和性および結合特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合の数および方向に関して選択される、適切な長さのリンカーを使用して、連結され得る（HyrupおよびNielsen（1996）前出）。PNA-DNAキメラの合成は、HyrupおよびNielsen、（1996）前出ならびにFinn P. J. ら、（1996）Nucleic Acids Res. 24（17）：3357-63に記載されるように実施され得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホロアミダイトカップリング化学および改変ヌクレオシドアナログを使用して、固体支持体上で合成され得る。例えば、5'-（4-メトキシトリチル）アミノ-5'-デオキシチミジンホスホルアミダイトが、PNAとDNAの5'末端との間として使用され得る（Mag, M. ら、（1989）Nucleic Acid Res. 17：5973-88）。次いで、PNAモノマーは、段階的な様式でカップリングされて、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する（Finnら、（1996）前出）。あるいは、キメラ分子は、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを用いて合成され得る（Peterser, K. H. ら、（1975）Bioorganic Med. Chem. Lett. 5：1119-11124）。

10

【0185】

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

20

30

【0186】

（VI. 本発明の方法において使用される、単離された25943タンパク質、および抗25943抗体）

本発明の方法は、単離された25943タンパク質およびこれらの生物学的に活性な部分、ならびに抗258943抗体を惹起するための免疫原として使用されるのに適切なポリペプチドフラグメントの使用を包含する。1つの実施形態において、ネイティブの25943タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する、適切な精製スキームによって、細胞供給源または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、25943タンパク質は、組換えDNA技術によって生成される。組換え発現の代わりに、25943のタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を使用して、化学的に合成され得る。

40

【0187】

本明細書中で使用する場合、25943タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、25943活性を有する、25943タンパク質のフラグメントを含む。25943タンパク質の生物学的に活性な部分は、25943タンパク質のアミノ酸配列に十分に同一であるか、あるいはこれらに由来するアミノ酸配列（例えば、全長の25943タンパク質より

50

少ないアミノ酸を含み、かつ25943タンパク質の少なくとも1つの活性を示す、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、25943タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。25943タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300以上のアミノ酸長である、ポリペプチドであり得る。25943タンパク質の生物学的に活性な部分は、25943活性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。

【0188】

好ましい実施形態において、本発明の方法において使用される25943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、25943タンパク質は、配列番号2に対して実質的に同一であり、そして配列番号2のタンパク質の機能的活性を保持するが、上記第V節において詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因して、アミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、本発明の方法において使用される25943タンパク質は、配列番号2に対して少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、またはそれ以上同一なアミノ酸配列を含むタンパク質である。

10

【0189】

2つのアミノ酸配列、または2つの核酸配列のパーセント同一性を決定するために、これらの配列は、最適な比較目的で整列される（例えば、ギャップは、最適な整列のために、第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入され得、そして非相同配列は、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%、なおより好ましくは少なくとも60%、およびさらにより好ましくは、少なくとも70%、80%または90%の長さである（例えば、308アミノ酸残基を有する、配列番号2の25943のアミノ酸配列に第2の配列を整列させる場合、少なくとも92、好ましくは少なくとも123、より好ましくは少なくとも154、なおより好ましくは少なくとも185およびなおより好ましくは少なくとも216、246、277またはそれ以上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）。ギャップの数を考慮して、2つの配列間のパーセント同一性は、それらの配列により共有される同一の位置の数、および2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要のある各ギャップの長さの関数である。

20

30

【0190】

配列の比較および2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成され得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）中のGAPプログラムに組み込まれたNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453（1970））のアルゴリズムを用い、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およびレングスウェイト（length weight）1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）中の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およびレングスウェイト1、2、3、4、5、または6

40

50

を用いて決定される。別の実施形態において、2つのアミノ酸配列間または2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0または2.0U）に組みこまれたMeyers, E. およびMiller, W. (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988)) のアルゴリズムを使用し、PAM120ウェイトレジデュートーブル (weight residue table)、ギャップペナルティー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。

【0191】

本発明の方法はまた、25943のキメラタンパク質または融合タンパク質を使用し得る。本明細書中で使用される場合、25943の「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非25943ポリペプチドに作動可能に連結された、25943ポリペプチドを含む。「25943ポリペプチド」は、25943分子に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいうが、一方、「非25943ポリペプチド」は、25943タンパク質に実質的に相同でないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド（例えば、25943タンパク質とは異なり、かつ同じ生物または異なる生物由来のタンパク質）をいう。25943融合タンパク質において、25943ポリペプチドは、25943タンパク質の全てまたは一部に対応し得る。好ましい実施形態において、25943融合タンパク質は、25943タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の好ましい実施形態において、25943融合タンパク質は、25943タンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結した」は、25943ポリペプチドおよび非25943ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されることを示すことが意図される。非25943ポリペプチドは、25943ポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0192】

例えば、1つの実施形態において、融合タンパク質は、GST-25943融合タンパク質であり、ここで、25943配列は、GST配列のC末端に融合されている。このような融合タンパク質は、組換え25943の精製を容易にし得る。

【0193】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、そのN末端において異種シグナル配列を含む25943タンパク質である。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）において、25943の発現および／または分泌は、異種シグナル配列の使用によって増大され得る。

【0194】

本発明の方法において使用される25943融合タンパク質は、薬学的組成物中に組み込まれ得、そして被験体にインビボで投与され得る。25943融合タンパク質は、25943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。25943融合タンパク質の使用は、例えば、以下によって引き起こされる障害の処置のために治療的に有用であり得る：(i) 25943タンパク質をコードする遺伝子の異常な改変または変異；(ii) 25943遺伝子の誤調節；ならびに(iii) 25943タンパク質の異常な翻訳後修飾。

【0195】

さらに、本発明の方法において使用される25943融合タンパク質は、被験体において抗25943抗体を産生するための免疫原として、25943リガンドを精製するために、そして25943と25943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。

【0196】

好ましくは、本発明の方法において使用される25943のキメラタンパク質または融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来技術に従って、例えば、連結のために平滑末端または付着末端を使用し、適切な末端を提供するための制限酵素消化を使用し、

10

20

30

40

50

適切な場合粘着末端を平滑化し、所望でない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理を使用し、そして酵素的連結を使用することによって一緒にインフレイムで連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成機を含む従来技術によって合成され得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅は、引き続いてアニーリングおよび再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成し得る2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハングを生じるアンカープライマーを使用して実施され得る（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、Ausubelら、編、John Wiley & Sons：1992を参照のこと）。さらに、すでに融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をコードしている多くの発現ベクターが市販されている。25943をコードする核酸は、この融合部分が、25943タンパク質にインフレイムで連結されるように、このような発現ベクター中にクローニングされ得る。 10

【0197】

本発明はまた、25943アゴニスト（模倣物）または25943アンタゴニストのいずれかとして機能する、25943タンパク質の改変体の使用に関する。25943タンパク質の改変体は、変異誘発（例えば、25943タンパク質の別個の点変異または短縮）によって生成され得る。25943タンパク質のアゴニストは、25943タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じ生物学的活性またはそのサブセットを保持し得る。25943タンパク質のアンタゴニストは、例えば、25943タンパク質の25943媒介性の活性を競合的に調節することによって、25943タンパク質の天然に存在する形態の活性の1以上を阻害し得る。従って、特定の生物学的効果は、機能が限定された改変体を用いる処置によって排除され得る。1つの実施形態において、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体を用いる被験体の処置は、25943タンパク質の天然に存在する形態を用いた処置と比較して、被験体における副作用がより小さい。 20

【0198】

1つの実施形態において、25943アゴニスト（模倣物）または25943アンタゴニストのいずれかとして機能する25943タンパク質の改変体は、25943タンパク質のアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性について、25943タンパク質の変異体（例えば、短縮変異体）のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって、同定され得る。1つの実施形態において、25943改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルでのコンビナトリアル変異誘発によって生成され、そして多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。25943改変体の多様なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって生成され得、その結果、潜在的な25943配列の縮重セットは、個々のポリペプチドとしてか、あるいはその中に25943配列のセットを含むより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイについて）発現可能である。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的な25943改変体のライブラリーを生成するために、種々の方法が使用され得る。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機において実施され得、次いで、この合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、潜在的な25943配列の所望のセットをコードする全ての配列を1つの混合物中で準備することを可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は、当該分野で公知である（例えば、Narang, S. A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakuraら、(1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakuraら、(1984) *Science* 198:1056; Ikeら、(1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477を参照のこと）。 30

【0199】

さらに、25943タンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーは、25943タンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のために、25943フラグメントの多様な集団を生成するために使用され得る。1つの実施形態において、コード配列 40 50

フラグメントのライブラリーは、25943コード配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニック形成が1分子当たりほぼ1回だけ生じるような条件下でヌクレアーゼで処理し、二重鎖DNAを変性し、異なるニック形成産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二重鎖DNAを形成するためにDNAを再生し、S1ヌクレアーゼでの処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、そして得られたフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することによって、生成され得る。この方法によって、種々のサイズの25943タンパク質のN末端フラグメント、C末端フラグメントおよび内部フラグメントをコードする、発現ライブラリーが誘導され得る。

【0200】

点変異または短縮によって作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするためのいくつかの技術、および選択された特性を有する遺伝子産物についてのcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技術が、当該分野で公知である。このような技術は、25943タンパク質のコンビナトリアル変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングのために適合可能である。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高スループットの分析に使用されやすい、最も広く使用される技術は、代表的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングする工程、ベクターの得られたライブラリーで適切な細胞を形質転換する工程、および所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にするような条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現する工程を包含する。再帰的アンサンブル変異誘発 (recursive ensemble mutagenesis (REM)) (これは、ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増強する新たな技術である) は、25943改変体を同定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る (Ark inおよびY ou v a n (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Del a g r a v e ら、(1993) Protein Eng. 6(3):327-331)。

【0201】

本発明の方法はさらに、抗25943抗体の使用を包含する。単離された25943タンパク質、またはそれらの一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を用いて、25943に結合する抗体を生成するための抗原として使用され得る。全長の25943タンパク質が使用され得るか、あるいは25943の抗原性ペプチドフラグメントが免疫原として使用され得る。25943の抗原性ペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列の少なくとも8アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体が、25943タンパク質と特異的に免疫複合体を形成するように、25943のエピトープを含む。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは、少なくとも15アミノ酸残基、さらにより好ましくは、少なくとも20アミノ酸残基、そして最も好ましくは、少なくとも30アミノ酸残基を含む。

【0202】

抗原性ペプチドにより含まれる、好ましいエピトープは、タンパク質の表面に局在される25943の領域 (例えば、親水性領域)、および高抗原性を有する領域である。

【0203】

25943免疫原は、代表的に、適切な被験体 (例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物) を、免疫原を用いて免疫することにより抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された25943タンパク質または化学的に合成された25943ポリペプチドを含み得る。この調製物はさらに、アジュバント (例えば、フロイントのアジュバントもしくは不完全なアジュバント)、あるいは類似の免疫刺激剤を含み得る。免疫原性の25943の調製物を用いる適切な被験体の免疫は、ポリクローナル抗25943抗体の応答を誘導する。

【0204】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン

ン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原（例えば、25943）に、特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子をいう。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、ペプシンのような酵素で抗体を処理することによって生成され得るF(ab)フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントが挙げられる。本発明は、25943分子に結合するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」は、25943の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位の1つの種のみを含む抗体分子の集団をいう。従って、モノクローナル抗体組成物は、代表的に、その抗体が免疫反応する、特定の25943タンパク質に対して単一結合親和性を示す。

【0205】

ポリクローナル抗25943抗体は、25943の免疫原を用いて適切な被験体を免疫することによって、上記のように調製され得る。免疫された被験体における、抗25943抗体の力価は、標準的な技術（例えば、免疫した25943を用いる、固相酵素免疫検出法（ELISA））によって、経時的にモニターされ得る。所望の場合、25943に対する抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液）から単離され得、そしてさらに、周知の技術（例えば、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィー）によって精製され得る。免疫後の適切なとき（例えば、抗25943抗体の力価が最も高いとき）に、抗体産生細胞は被験体から入手され得、そして標準的な技術（例えば、KohlerおよびMilstein（1975）Nature 256:495-497）（Brownら（1981）J. Immunol. 127:539-46；Brownら（1980）J. Biol. Chem. 255:4980-83；Yehら（1976）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:2927-31；ならびにYehら（1982）Int. J. Cancer 29:269-75もまた参照のこと）によってもともと記載されるハイブリドーマ技術、最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozborら（1983）Immunol Today 4:72）、EBV-ハイブリドーマ技術（Coleら（1985）Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）またはトリーマ技術）によってモノクローナル抗体を調製するために使用され得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成するための技術は周知である（一般的に、Kenneth, R. H., Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York（1980）；Lerner, E. A.（1981）Yale J. Biol. Med. 54:387-402；Geftter, M. L.ら（1977）Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照のこと）。簡単に言えば、不死化した細胞株（代表的に黒色腫）は、上記のような25943免疫原で免疫した哺乳動物に由来するリンパ球（代表的に脾細胞）と融合され、そして得られたハイブリドーマ細胞の、細胞培養上清は、25943に結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを同定するためにスクリーニングされる。

【0206】

リンパ球と不死化細胞株との融合のために使用される、任意の多くの周知のプロトコルが、抗25943モノクローナル抗体を生成する目的のために適用され得る（例えば、GalFRE, G.ら（1977）Nature 266:550-52；Geftterら（1977）前出；Lerner（1981）前出；およびKenneth（1980）前出を参照のこと）。さらに、当業者は、このような方法の多くのバリエーションもまた有用であることを理解する。代表的に、不死化細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）は、リンパ球のような同一の哺乳動物由来である。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫したマウスに由来するリンパ球と、不死化マウス細胞株とを融合することによって作製され得る。好ましい不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（「HAT培地」）を含む培養培地に感受性である、マウス骨髓腫細胞株で

10

20

30

40

50

ある。任意の多くの骨髓腫細胞株が、標準的な技術に従う融合パートナー（例えば、P3-NS1/1-Ag4-1 骨髓腫細胞株、P3-x63-Ag8.653 骨髓腫細胞株またはSp2/O-Ag14 骨髓腫細胞株）として使用され得る。これらの骨髓腫細胞株は、ATCCから入手可能である。代表的に、HAT感受性マウス骨髓腫細胞株は、ポリエチレングリコール（「PEG」）を用いてマウス脾細胞に融合される。次いで、融合によって得られたハイブリドーマ細胞は、HAT培地を用いて選択される（これは、融合していない骨髓腫細胞および非生産性融合骨髓腫細胞を殺傷する（融合していない脾細胞は形質転換されないので、数日後に死滅する））。本発明のモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISAアッセイを用いて、25943に結合する抗体について、ハイブリドーマ培養物の上清をスクリーニングすることによって検出される。

【0207】

モノクローナル抗体スクリーニングハイブリドーマを調製する代わりに、モノクローナル抗25943抗体は、25943を用いて、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定および単離され得、それによって、25943に結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを生成およびスクリーニングするためのキットは、市販されている（例えば、the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびthe Stratagene SurfZAPTM Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの生成およびスクリーニングにおける使用のために特に適切な方法および試薬の例は、以下において見出され得る：例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、PCT国際出願番号WO92/18619；Dowerら、PCT国際出願番号WO91/17271；Winterら、PCT国際出願WO92/20791；Marklandら、PCT国際出願番号WO92/15679；Breitlingら、PCT国際出願WO93/01288；McCaffertyら、PCT国際出願番号WO92/01047；Garrardら、PCT国際出願番号WO92/09690；LadnerらPCT国際出願番号WO90/02809；Fuchsら（1991）Bio/Technology 9:1369-1372；Hayら（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huseら（1989）Science 246:1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J 12:725-734；Hawkinsら（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896；Clacksonら（1991）Nature 352:624-628；Gramら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580；Garrardら（1991）Biotechnology (NY) 9:1373-1377；Hoogenboomら（1991）Nucleic Acid Res. 19:4133-4137；Barbasら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982；およびMcCaffertyら（1990）Nature 348:552-554。

【0208】

さらに、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る、組換え抗25943抗体（例えば、ヒトおよび非ヒトの両方の部分を含むキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体）は、本発明の方法の範囲内にある。このようなキメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、以下に記載される方法を用いて、当該分野に公知の組換えDNA技術によって作製され得る：Robinsonら国際出願番号PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号；Morrisonら、欧州特許出願第173,494号；Neubergerら、PCT国際出願番号WO86/01533；Cabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特

許出願第125, 023号; Betterら(1988) Science 240:1041-1043; Liuら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら(1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら(1987) Cancer Res. 47:999-1005; Woodら(1985) Nature 314:446-449; Shawら(1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oiら(1986) BioTechniques 4:214; Winter、米国特許第5, 225, 539号; Jonesら(1986) Nature 321:552-525; Verhoeyenら(1988) Science 239:1534; および Beidlerら(1988) J. Immunol. 141:4053-4060。

【0209】

抗25943抗体を用いて、(例えば、細胞溶解産物または細胞上清中の)25943タンパク質を検出して、25943タンパク質の発現の量およびパターンを評価し得る。抗25943抗体を診断的に用いて、臨床試験手順の一部として、組織中でのタンパク質レベルをモニタリングして、例えば、所定の処置レジメンの効力を決定し得る。検出は、この抗体を検出可能な物質へと結合させる(すなわち、物理的に連結させる)ことによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生体発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ; 適切な補欠分子族錯体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ; 適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ; 発行物質の例としては、ルミノールが挙げられ; 生体発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ; そして適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0210】

(V I I. 電子装置読取り可能な媒体およびアレイ)
25943配列情報を含む電子装置読取り可能な媒体もまた提供される。本明細書中で使用される場合、「25943配列情報」とは、特に、本発明の25943分子に対する任意のヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列情報をいい、全長のヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列、部分的なヌクレオチド配列および/またはアミノ酸配列、多型配列(1ヌクレオチド多型(SNP)を含む)、エピトープ配列などを包含するがこれらに限定されない。さらに、この25943配列情報に「関連した」情報としては、配列の存在または非存在の検出(例えば、配列、フラグメント、多型などの発現の検出)、配列レベルの決定(例えば、発現レベルの検出(例えば、定量的検出))、配列に対する反応性の検出(例えば、配列特異的抗体を用いた、例えば、タンパク質発現および/またはタンパク質レベルの検出)などが挙げられる。本明細書中で使用される場合、「電子装置読取り可能な媒体」とは、電子装置によって読取られ得るそして直接アクセスされ得る、データまたは情報を、記憶、保持または含むための任意の適切な媒体をいう。このような媒体としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 磁気記憶媒体(例えば、フロッピー(登録商標)ディスク、ハードディスク記録媒体、および磁気テープ); 光学記憶媒体(例えば、コンパクトディスク); 電子記憶媒体(例えば、RAM、ROM、EPROM、EEPROMなど); ならびに一般的ハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド(例えば、磁気/光学記憶媒体)。この媒体は、本発明の25943配列情報を記録するに適合または構成される。

【0211】

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

【0212】

本明細書中で使用される場合、「記録される」とは、電子装置読取り可能媒体へと情報を記録またはコードするためのプロセスをいう。当業者は、公知の媒体に情報を記録して25943配列情報を含む製造品を作製するために現在公知の方法のいずれかを容易に採用し得る。種々のソフトウェアプログラムおよび形式を用いて、配列情報を電子装置読取り可能媒体に記録し得る。例えば、この配列情報は、ワード処理テキストファイルで表されてもよく、市販のソフトウェア（例えば、WordPerfectおよびMicrosoft Word）の形式にされてもよく、ASCIIファイル形式で表されてもよく、またはデータベースアプリケーション（例えば、DB2、Sybase、Oracleなど）ならびに他の形式で記録され得る。多数のデータ処理構造形式（例えば、テキストファイルまたはデータベース）を用いて、25943配列情報が記録された媒体を入手または作製し得る。

【0213】

25943配列情報を読み取り可能な形式で提供することによって、種々の目的でその配列情報に慣用的にアクセスし得る。例えば、当業者は、配列情報を読み取り可能な形式で用いて、標的配列または標的構築モチーフと、データ記憶手段内に記録された配列情報とを比較し得る。検索手段を用いて、特定の標的配列または標的モチーフと一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

【0214】

それゆえ、本発明は、被験体が25943関連疾患もしくは25943関連障害を有するかまたは25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を実施するための指示書を保持するための媒体を提供し、ここで、この方法は、その被験体に関連した25943配列情報を決定し、そしてこの25943配列情報に基づいて、この被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいはその疾患、障害または疾患前状態について特定の処置を推奨する工程を包含する。

【0215】

本発明はさらに、電子システムおよび／またはネットワークにおいて、被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943に関連した疾患に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、ここで、この方法は、その被験体に関連した25943配列情報を決定し、そしてこの25943配列情報に基づいて、この被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程、ならびに／あるいはその疾患、障害または疾患前状態について特定の処置を推奨する工程を包含する。この方法はさらに、その被験体に関連した表現型情報を受け取る工程、および／またはネットワークから、その被験体に関連した表現型情報を獲得する工程を含み得る。

【0216】

本発明はまた、ネットワークにおいて、被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、この方法は、25943配列情報をこの被験体および／またはそれに関連した情報から受け取る工程、この被験体に関連した表現型情報を

受け取る工程、このネットワークから、25943および／または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対応する情報を獲得する工程、ならびにこの表現型情報、25943情報（例えば、配列情報および／またはそれに関連した情報）、および獲得された情報のうちの1以上に基づいて、この被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程を包含する。この方法は、この疾患、障害または疾患前状態について特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

【0217】

本発明はまた、被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定するためのビジネス方法を提供し、この方法は、25943に関連する情報（例えば、配列情報および／またはそれに関連した情報）を受け取る工程、この被験体に関連した表現型情報を受け取る工程、このネットワークから、25943に関連した情報および／または25943関連疾患もしくは25943関連障害に関連した情報を獲得する工程、ならびに、表現型情報、25943情報、および獲得した情報のうちの1以上に基づいて、この被験体が、25943関連疾患もしくは25943関連障害または25943関連疾患もしくは25943関連障害に対する素因を有するか否かを決定する工程を包含する。この方法は、この疾患、障害または疾患前状態について特定の処置を推奨する工程をさらに包含し得る。

10

【0218】

本発明はまた、本発明の25943配列を含むアレイを包含する。このアレイを用いて、このアレイにおける1以上の遺伝子の発現をアッセイし得る。1つの実施形態では、このアレイを用いて、組織における遺伝子発現をアッセイして、このアレイにおける遺伝子の組織特異性を確認し得る。このようにして、約7600個までの遺伝子が、発現について同時にアッセイされ得、これらのうちの1つが25943であり得る。これは、1以上の組織において特異的に発現される一連の遺伝子を示すプロファイルが開発されることを可能にする。

20

【0219】

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

30

40

【0220】

別の実施形態では、このアレイを用いて、このアレイ中の1以上の遺伝子の発現の時間経過をモニタリングし得る。これは、例えば、本明細書中に開示されるような、種々の生物学的状況（例えば、25943関連疾患もしくは25943関連障害の発症、25943関連疾患もしくは25943関連障害の進行、およびプロセス（例えば、25943関連疾患または25943関連障害に関連した細胞トランスフォーメーション））において生じ得る。

【0221】

このアレイはまた、同じ細胞または異なる細胞における他の遺伝子発現に対するその遺伝

50

子発現の影響を確認するため（例えば、他の遺伝子発現に対する25943発現の影響を確認するため）に有用である。これは、例えば、最終的または下流の標的が調節できない場合、治療介入のための代替の分子標的の選択を提供する。

【0222】

このアレイはまた、正常細胞および異常細胞における1以上の遺伝子の示差的発現パターンを確認するために有用である。これは、診断または治療介入のための分子標的として役立ち得る一連の遺伝子（例えば、25943を含む）を提供する。

【0223】

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

10

【実施例】

【0224】

（実施例1：グリコシルアスパラギナーゼ活性の測定（方法1））

本実施例は、グリコシルアスパラギナーゼ分子（例えば、25943分子）の活性を決定するための方法を記載する。本方法は、Noronkoski, T. ら（1998）J. Biol. Chem. 273: 26295-26297（本明細書中に参考として援用される）に従って実施される。

【0225】

（材料）

20

25943を、Mononen, I. ら（1995）FASEB J. 9: 428-433およびKaartinen, V. ら（1991）J. Biol. Chem. 266: 5860-5869（本明細書中に参考として援用される）の方法に従って、25943発現細胞から均質になるまで精製し得る。精製プロトコルとしては、カプリル酸沈澱、コンカナバリンAレクチンを用いたアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびアニオン交換クロマトグラフィーが挙げられる。25943活性を含む画分をプールし、そして調製物の純度を、標準的な方法を用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および銀染色を用いて評価する。β-アスパルテームおよびβ-アスパルチルグリシンを、Bachem Feinchemikalien AG（Bubendorf, Switzerland）から購入し得る。他のペプチドを、Hanson, R. W. およびRydon, H. N. （1964）J. Chem. Soc. 115: 836-842、ならびにCohen-Anisfeld, S. T. およびLansbury, P. T., Jr. （1993）J. Am. Chem. Soc. 115: 10531-10537（本明細書中に参考として援用される）に記載されるとおりに調製する。H-Ser-HN₂ および他のアミドを、HansonおよびRydon（1964）前出、ならびにFastrez, J. およびFersht, A. R. （1973）Biochemistry 12: 2025-2034（本明細書中に参考として援用される）に記載の通りに作製する。β-グリコシルアミン（1-アミノ-N-アセチルグルコサミン；GlcNAc-NH₂）、β-アスパルチルグルコサミン（GlcNAc-Asn）、およびアスパラギン酸β-メチルエステル（H-Asp(OMe)-OH）は、Sigma（St. Louis, MO）製である。

30

40

【0226】

（酵素アッセイ）

25943のグリコシルアスパラギナーゼ活性を、AspAMCを基質として用いた蛍光測定方法（Mononen, I. ら（1993）Anal. Biochem. 208: 372-374（本明細書中に参考として援用される））を用いて測定する。β-アスパルチル化合物のグリコシルアスパラギナーゼ触媒加水分解についての反応速度パラメーターを、分光測光アッセイ（Tarantino, A. L. およびMaley, F. （1969）Arch. Biochem. Biophys. 130: 295-303；Noronkoski, T. およびMononen, I. （1997）Glycobiology

50

7:217-220)を用いて決定する。最小平方Lineweaver-Burk分析を、Michaelis定数(K_m)および最大反応速度(V_{max})の決定において用いる。

【0227】

(β -アスパルチルペプチドのアッセイ)

それらの25943触媒合成の間の β -アスパルチルペプチドの形成を、Mononen, I. ら(1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 218-510-513 (本明細書中に参考として援用される)に記載されるとおりに測定する。種々の量の β -アスパルチルドナーおよび β -アスパルチルアクセプターを、50mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5)中で37℃にて、25943の存在下でインキュベートする。インキュベーション混合物のアリコートをHPLCカラムに注入し、そして β -アスパルチルペプチドの形成を測定する。高性能液体クロマトグラフィーを、250×4.6mm(内径)アミノカラム(Spherisorb-NH₂, 5 μ m粒子)、2.5mM KH₂PO₄/アセトニトリル(aceotnitrile)(40/60 v/v、pH4.6)でのイソクラティック溶出(isocratic elution)、流速1ml/分および検出波長214nmを用いて、Mononenら(1996)前出に記載の通りに実施する。

10

【0228】

(実施例2:グリコシルアスパラギナーゼ活性の測定(方法2))

本実施例は、グリコシルアスパラギナーゼ分子(例えば、25943分子)の活性を決定するための方法を記載する。この方法を、Noronkowski, T. ら(1997) FEBS Lett. 412:149-152 (本明細書中に参考として援用される)に従って実施する。

20

【0229】

(材料)

25943を、実施例4において上記の通り精製し得る。総タンパク質を、Bio-Radタンパク質アッセイキット(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, U. S. A.)を用いて決定する。アスパルチルグルコサミン、フェニルイソチオシアネート、およびカルボキシメチルシステインは、Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U. S. A. の製品である。アスパラギンおよびアスパラギン酸は、E. Merck, Darmstadt, Germanyから購入され得る。全ての他の試薬は、分析グレードの試薬であり、さらなる精製を行わずに用いられる。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)を、Merck/Hitachi L-6200液体クロマトグラフ(Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)を用いて実施する。このカラムは、Spherisorb S3 ODS2(150×4.6mm、内径)(Phase Separations Ltd., Deeside, U. K.)である。

30

【0230】

(酵素アッセイ)

グリコシルアスパラギナーゼ活性についてのアッセイは、反応成分GlcNAc-Asn、AsnおよびAspのフェニルイソチオシアネート(PITC)誘導体化(Mononen, I. T. ら(1993) Anal. Biochem. 208:372-374; Ebert, R. F. (1986) Anal. Biochem. 154:431-435; 本明細書中に参考として援用される)後の、それらのHPLC分析に基づく。カルボキシメチルシステイン(CmCys)を、内部標準として用いる。反応速度定数および阻害定数を22℃で決定し、そしてインキュベーション混合物は、総容量50 μ lの50mMナトリウム-カリウムリン酸緩衝液(pH7.5)中に種々の量のGlcNAc-Asnおよび/またはAsn、0.8mM CmCys、および25943を含む。

40

【0231】

(実施例3:グリコシルアスパラギナーゼ活性の測定(方法3))

50

本実施例は、グリコシルアスパラギナーゼ分子（例えば、25943分子）の活性を決定するための方法を記載する。この方法を、Liu, Y. ら（1996）J. Biol. Chem. 6: 527-536（本明細書中に参考として援用される）に従って実施する。

【0232】

グリコシルアスパラギナーゼ活性を、基質 N^4 - (β-N-アセチルグルコサミニル) - L-アスパラギン (GlcNAc-Asn) (Bachem, Torrance, CA, U. S. A.) からのN-アセチルグルコサミンの遊離を測定すること (Tollersrud, O. K. および Aronson, N. N., Jr. (1989) Biochem. J. 260: 101-108) によってアッセイする。20 μl の 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中に 2.5 mM 基質を含む反応物を、適切な時間、37℃にて、25943とともにインキュベートし、そして50 μl の 250 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.8) を添加した後3分間煮沸することによって停止する。遊離されたN-アセチルグルコサミンを、Morgan-Elson反応によってアッセイする。1単位の25943は、1分間あたり1 μmol のN-アセチルグルコサミンを遊離させる。

10

【0233】

（実施例4：Sf9細胞からの25943の精製）

以下の方法を、Liu, Y. ら（1996）J. Biol. Chem. 6: 527-536（本明細書中に参考として援用される）に従って実施する。25943を、適切なベクター中にクローニングし、そしてSf9昆虫細胞中で発現させる。細胞を、10リットルのHyQ CCM-3培地 (Hyclone Lab. Inc., Logan, UT, U. S. A.) 中で、99%の生存率で、 1.75×10^6 / ml の最終細胞密度になるまで回転培養する。細胞を、2000 rpmにて10分間の遠心分離によって4℃にて収集する。細胞ペレットをリン酸緩衝液化生理食塩水 (PBS) で1回洗浄し、0.15 M NaClを含む、50 ml の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 中に次いで再懸濁する。細胞を、超音波処理によって均質化し、続いて、15,000 rpmで30分間、4℃にて遠心分離する。細胞溶解産物上清を、0.15 M NaClを含む50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化したコンカナバリンA Sepharose (Sigma) でのクロマトグラフィーに、冷たい状態でかける。結合していないタンパク質を、300 ml の緩衝液を用いてこのカラムから洗浄し、そして結合したグリコシル化タンパク質を、0.2 M メチルα-マンノシド (Sigma) によって溶出させる。溶出した25943を、YM-10メンブレンを備えたAmicon限外ろ過セル (Amicon Corp., Danvers, MA, U. S. A.) 中で約20 ml になるまで濃縮する。リン酸ナトリウム緩衝液を、限外ろ過を3回繰り返すことによって、0.02 M Tris-HCl (pH 8.5) に交換する。濃縮された25943サンプルを、0.02 M Tris-HCl (pH 8.5) で予め平衡化されたDE52-セルロース (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England) アニオン交換カラムに適用する。このカラムを、400 ml の線形NaCl勾配（同じTris緩衝液中で0~0.4 M）を用いて0.5 ml / 分で溶出させる。4 ml 画分を収集し、そして25943を含む画分を合わせ、3 ml になるまで濃縮し、そして0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) で平衡化したSephadex G-150-120 (Sigma) でのゲル濾過に供する。このカラムを0.25 ml / 分で流し、そして2.5 ml の画分を収集する。25943を含む画分を合わせ、そしてYM-10メンブレンを用いて3 ml になるまで濃縮する。このサンプルを、0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) で平衡化したカラムでのCM52-セルロース (Whatman) カチオン交換クロマトグラフィーに供する。25943を、0~0.4 M の線形NaCl勾配を含む100 ml の同じ緩衝液によって溶出させる。このカラムを0.25 ml / 分で流し、そして2 ml 画分を収集する。25943画分を合わせ、そしてCentricon 10限外ろ過 (Amicon Corp.) によって1 ml になるまで濃縮する。

20

30

40

50

【0234】

(実施例5：細胞の足場非依存性増殖についての軟寒天アッセイ)

(ベース寒天)

1%寒天(DNAグレード)を電子レンジ中で融解し、そして水浴中で40℃まで冷却する。2×RPMI培地+20%ウシ胎仔血清(FCS)をまた、水浴中で40℃まで温める。等しい容量のこれらの2つの溶液を混合して、0.5%寒天+1×RPMI+10% FCSを得る。1.5mlを各35mm Petriプレートに注ぎ、そして固まらせる。このプレートは、4℃にて1週間まで保存され得る。

【0235】

(トップ寒天)

0.7%アガロース(DNAグレード)を電子レンジ中で融解し、水浴中で40℃まで冷却する。2×RPMI+20% FCSもまた、同じ温度まで温める。

【0236】

(細胞)

アッセイされるべき細胞(例えば、胸部細胞、卵巣細胞、肺細胞または結腸細胞)をトリプシン処理し、培地中に懸濁し、そして計数する。ポジティブコントロール(例えば、ras形質転換細胞株)を常に用いるべきである。細胞懸濁物の濃度を、200,000細胞/mlに調整する。

【0237】

(プレーティングおよび染色)

0.1mlの細胞懸濁物を、10mlのキャップした遠心管に添加する。ベース寒天を含む35mm Petriプレートを、プレーティングの30分前に4℃から取り出して、これらを室温まで温める。3mlの2×RPMI+10%または20% FCSおよび3ml 0.7%アガロースを細胞懸濁物の各管に添加し、そして穏やかに混合する。1.5mlのこの混合物を各複製プレート(各プレートは、3連で行われる)に添加し、そしてアガロースを凝固させる。このプレートを、加湿インキュベーター中で37℃にて10~14日間インキュベートする。このインキュベーション期間の完了後、このプレートを0.5mlの0.005% Crystal Violetで少なくとも1時間染色する。次いで、コロニーを、解剖顕微鏡を用いて計数する。

【0238】

(実施例6：血清、血漿、またはリンパ球におけるグリコシルアスパラギナーゼ活性についての蛍光測定アッセイ)

本実施例は、被験体の血清、血漿、またはリンパ球由来のグリコシルアスパラギナーゼ分子(例えば、25943分子)の活性を決定するための方法を記載する。この方法を、Mononen, I.ら(1994) Clin. Chem. 40:385-388(本明細書中に参考として援用される)に従って実施する。

【0239】

(材料)

基質AspAMCおよび標準7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)を、Bachem AG, Bubendorf, Switzerlandから購入し得る。Ficoll-Paqueを、Pharmacia, Uppsalla, Swedenから購入する。全ての他の試薬は、分析グレードの試薬であり、さらなる精製を行わずに用いられる。

【0240】

(サンプル)

血清サンプルおよび血漿サンプル、ならびに培養された線維芽細胞の細胞株を、被験体から得る。リンパ球を、製造業者の指示書に従ってFicoll-Paqueを用いた密度勾配遠心分離によって単離する。サンプルを、分析まで-20℃で凍結保存する。

【0241】

(ヘモグロビン濃度およびビリルビン濃度の影響)

インキュベーション混合物中でのヘモグロビンおよび/またはビリルビンの存在は、グリ

10

20

30

40

50

コシルアスパラギナーゼ活性に対して相当な阻害的影響を有する。従って、測定値を、ヘモグロビン濃度および／またはビリルビン濃度の標準に対して比較する。

【0242】

血液サンプルを、10mlを24時間凍結し、次いで解凍することによって溶血する。血清を3000gにて10分間の遠心分離後に分離し、そして正常血清と種々の比率で混合する。ヘモグロビン濃度を、Ferencz, A. およびBasco, M. (1983) Clin. Chem. 134:103-106の方法に従って決定する。

【0243】

(グリコシルアスパラギナーゼ活性)

25943のグリコシルアスパラギナーゼ活性を、100μlのAspAMC (エチレングリコール中10mmol/L)、および10ml/Lエチレングリコールを含む90μlのTris-HCl緩衝液(50mmol/L, pH7.5)を60~240分間、37℃でインキュベートすることによって、血漿または血清中でアッセイする。リンパ球のグリコシルアスパラギナーゼ活性を、200μlの最終容量の、10ml/Lエチレングリコールを含む50mmol/L Tris-HCl (pH7.5)中の0.5mmol/L基質(Mononen, I. T., ら(1993) Anal. Biochem. 208:372-374)を用いて測定する。蛍光を、IL Multistat III Plus 蛍光遠心分離分析機 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) を350nm (励起) および450nm (発光) で用いて測定する。血漿および血清中のグリコシルアスパラギナーゼ活性は、mU/Lとして表される。リンパ球中の活性は、mU/gタンパク質として表される。1単位のグリコシルアスパラギナーゼは、37℃にて1分間あたり、基質から1μmolのAMCを遊離させる。タンパク質を、タンパク質アッセイキット (Bio-Rad Labs, Richmond, CA) およびKone Compact 臨床分析機 (Kone Instruments, Espoo, Finland) を用いて決定する。

【0244】

(実施例7: グリコシルアスパラギナーゼ活性についての蛍光測定アッセイ (方法4))

本実施例は、グリコシルアスパラギナーゼ分子 (例えば、25943分子または25943モジュレーター) の活性を決定するための方法を記載する。この方法を、Mononen, I. T. ら(1994) Analytical Biochem. 208:372-374 (本明細書中に参考として援用される) に従って実施する。

【0245】

(材料)

AspAMCおよびAMCは、Bachem AG (Bubendorf, Switzerland) 製である。グリコシルアスパラギナーゼの特異的インヒビターである、5-ジアゾ-4-オキソ-L-ノルバリン (Kaartinen, V. ら(1991) J. Biol. Chem. 266:5860-5869) を、Handschoemacher, R. E. ら(1968) Science 161:62-63の方法に従って合成する。

【0246】

(生物学的サンプル)

白血球を10mlの血液から、Kaartinen, V. およびMononen, I. (1990) Anal. Biochem. 190:98-101) に記載されるとおりに単離し、そして、組織培養プレートから単離された線維芽細胞と同様に、0.2% Triton X-100および0.5mM EDTAを含む50mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁する。

【0247】

(アッセイ)

蛍光測定グリコシルアスパラギナーゼアッセイを、総容量100μlの、0.2% エチレングリコールを含む50mM Tris-HCl (pH7.5) 中の1mM基質を用いて37℃にて実施する。7-アミノ-4-メチルクマリンの遊離を、IL Multis

tat III plus 蛍光遠心分離分析機 (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) を用いて蛍光測定によって測定する。励起波長および発光波長はそれぞれ、350nm および 450nm である。較正グラフのために、この基質は、種々の濃度の AMC によって置き換えられる。全ての酵素活性を $\mu\text{U}/\text{mg}$ タンパク質として表し、ここで、1 単位は、37℃ にて 1 分間あたり 1 μmol の AMC の遊離を引き起こす酵素量を示す。総タンパク質濃度を、Bio-Rad タンパク質アッセイ試薬キットを用いて決定する。

【0248】

(実施例 8: Taqman 分析を用いた、ヒト 25943 mRNA の組織発現分析)
本実施例は、TaqManTM 手順を用いて決定した場合のヒト 25943 mRNA の組織分布を記載する。TaqmanTM 手順は、mRNA を検出するための、定量的な、逆転写 PCR ベースのアプローチである。RT-PCR 反応は、PCR の間に TaqManTM プローブを切断する、AmpliTaq GoldTM DNA Polymerase の 5' ヌクレアーゼ活性を利用する。手短に述べると、cDNA を、目的のサンプルから作製し、そして PCR 増幅のための出発物質として用いた。5' 遺伝子特異的プライマーおよび 3' 遺伝子特異的プライマーに加えて、(増幅される領域に相補的な) 遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ (すなわち、TaqmanTM プローブ) を、この反応において含んでいた。TaqManTM プローブは、蛍光レポーター色素 (例えば、FAM (6-カルボキシフルオレセイン)、TET (6-カルボキシ-4, 7, 2', 7'-テトラクロロフルオレセイン)、JOE (6-カルボキシ-4, 5-ジクロロ-2, 7-ジメトキシフルオレセイン)、または VIC) がプローブの 5' 末端に共有結合しており、そしてクエンチャー色素 (TAMRA (6-カルボキシ-N, N, N', N'-テトラメチルローダミン) がそのプローブの 3' 末端に共有結合している、オリゴヌクレオチドを含んでいた。

【0249】

PCR 反応の間、このプローブの切断は、このレポーター色素とこのクエンチャー色素とを分離し、レポーターの蛍光の増大をもたらす。PCR 産物の蓄積を、レポーター色素の蛍光の増加をモニタリングすることによって直接的に検出した。プローブがインタクトであった場合、このレポーター色素がこのクエンチャー色素に対して近接していることにより、レポーターの蛍光の抑制をもたらした。PCR の間、目的の標的が存在する場合、このプローブは、正方向プライマー部位と逆方向プライマー部位との間で特異的にアニーリングした。AmpliTaq GoldTM DNA Polymerase の 5'-3' ヌクレオチド分解 (nucleolytic) 活性によって、このプローブは、このプローブがこの標的にハイブリダイズした場合のみ、このレポーターとこのクエンチャーとの間で切断された。次いで、このプローブフラグメントがこの標的から置換され、そして鎖の重合が続いた。このプローブの 3' 末端をブロックして、PCR の間のこのプローブの伸長を防いだ。このプロセスは、全てのサイクルにおいて生じ、そして産物の指数関数的蓄積を妨害しなかった。RNA をトリアゾール法を用いて調製し、そして DNase で処理して、夾雑するゲノム DNA を除去した。cDNA を、標準的技術を用いて合成した。逆転写酵素の非存在下での偽 cDNA 合成は、コントロール遺伝子の検出可能な PCR 増幅がないサンプルをもたらした。このことは、ゲノム DNA 夾雑物の効率的除去を確認する。

【0250】

ヒト 25943 mRNA の発現を、種々の細胞型および組織において調べた。表 1 に示すように、25943 は、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC)、腎臓、正常皮膚、正常脳皮質、視床下部、卵巣腫瘍、肺腫瘍、および赤血球系細胞において高度に発現される。表 1 はまた、25943 の発現が、正常卵巣組織と比較した場合、卵巣腫瘍においてアップレギュレートされ；正常結腸組織と比較した場合、結腸腫瘍においてアップレギュレートされ；そして慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の条件下の肺組織と比較した場合、肺腫瘍においてアップレギュレートされることを実証する。

【0251】

(実施例9：TaqManおよびインサイチュ分析を用いた、結腸癌におけるヒト25943 mRNAの発現分析)

本実施例は、TaqManTM手順(上記)およびインサイチュハイブリダイゼーション分析を用いて決定した場合の、種々の結腸腫瘍および細胞株におけるヒト25943 mRNAの発現を記載する。

【0252】

インサイチュ分析のために、種々の腫瘍および正常組織を、最初にドライアイス上で凍結させた。これらの組織の10μm厚さの切片を、DEPC処理1×リン酸緩衝化生理食塩水中の4%ホルムアルデヒドで室温にて10分間後固定(postfix)し、その後、DEPC 1×リン酸緩衝化生理食塩水中で2回および0.1Mトリエタノールアミン-HCl(pH8.0)中で1回リンスした。0.25%無水酢酸-0.1Mトリエタノールアミン-HCl中で10分間インキュベートした後、切片をDEPC 2×SSC(1×SSCは、0.15M NaCl+0.015Mクエン酸ナトリウムである)中でリンスした。次いで、組織を一連のエタノール洗浄液に通して脱水し、100%クロロホルム中で5分間インキュベートし、次いで、100%エタノール中で1分間および95%エタノール中で1分間リンスし、そして風乾させた。

10

【0253】

ハイブリダイゼーションを、³⁵S-放射標識(5×10⁷cpm/ml)cRNAプローブを用いて実施した。プローブを、600mM NaCl、10mM Tris(pH7.5)、1mM EDTA、0.01%剪断サケ精子DNA、0.01%酵母tRNA、0.05%酵母総RNA X1型、1×デンハルト溶液、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、100mMジチオトレイトール、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、および0.1%チオ硫酸ナトリウムを含む溶液の存在下で、55℃にて18時間インキュベートした。

20

【0254】

ハイブリダイゼーション後、スライドを、2×SSCで洗浄した。次いで、切片を、37℃にて、TNE(10mM Tris-HCl(pH7.6)、500mM NaCl、および1mM EDTAを含む溶液)中で10分間、1mlあたり10μgのRNase Aを含むTNE中で30分間、そして最後にTNE中で10分間、順次インキュベートした。次いで、スライドを、室温にて2×SSCでリンスし、50℃にて1時間、2×SSCで洗浄し、55℃にて1時間、0.2×SSCで洗浄し、そして60℃にて1時間、0.2×SSCで洗浄した。次いで、切片を、連続エタノール-0.3M酢酸ナトリウム濃縮物を通して迅速に脱水し、その後、風乾し、そしてKodak Biomax MR科学的画像化フィルムに24時間にわたって曝露し、続いてNB-2写真乳剤(photoemulsion)に浸し、そして4℃にて7日間曝露し、その後現像し、そして対比染色した。

30

【0255】

(TaqMan-固形腫瘍)

ヒト25943の発現を、固形ヒト結腸腫瘍において調べた。表2に示すように、25943発現は、正常結腸組織と比較して、3/4の結腸腫瘍においてアップレギュレートされる。25943発現はまた、正常肝臓組織と比較して、肝臓に対する結腸転移物においてアップレギュレートされる。

40

【0256】

ヒト25943の発現をまた、腫瘍形成の種々の病期の種々の固形ヒト結腸腫瘍において調べた。表5および表6(これは、同じ腫瘍サンプルの2連分析である)に示すように、25943は、2/2の腺腫において(正常結腸と比較して)、1/5の病期Bの腺癌において(正常結腸と比較して)、2/6の病期Cの腺癌において(正常結腸と比較して)、そして1/5の肝臓転移物において(正常肝臓および正常結腸と比較して)高度に発現される。

50

【0257】

ヒト25943の発現を、肝臓に対する結腸転移物においてさらに調べた。表7において示すように、25943は、4/17の転移物において、正常肝臓および正常結腸と比較して高度に発現される。25943はまた、1つの病期が早期の腺癌サンプルにおいて、正常結腸と比較して高度に発現される。

【0258】

(インサイチュハイブリダイゼーション—固形腫瘍)

インサイチュハイブリダイゼーション分析は、ヒト25943が、腫瘍(3/3の陽性サンプル)および転移性癌(3/4の陽性サンプル)において発現されるが、形成異常/腺腫(0/3の陽性サンプル)でも、正常結腸上皮(0/3の陽性サンプル)でも、正常肝臓(0/2の陽性サンプル)でも発現されないことを示した。

10

【0259】

(TaqMan—インビトロモデル)

ヒト25943の発現を、多数の異種移植に好都合な結腸腫瘍細胞株において調べた。これらの細胞株は、マウスに注射した場合、腫瘍を生じ得る。表3および表4に示すように、25943は、DL D1(病期C)細胞、SW620(病期C)細胞、およびHCT116細胞において高度に発現される。

【0260】

ヒト25943の発現をまた、細胞周期に入るように誘導した、同調結腸腫瘍細胞において調べた。表9に示すように、25943の発現は、アフィジコリンを用いて同調したHCT116細胞において顕著には調節されなかった。アフィジコリンは、細胞周期のG1期でブロックする。25943の発現は、ノコダゾールを用いた同調後に細胞周期を通じた進行の間、HCT116細胞において調節されなかった。ノコダゾールは、細胞周期のG2/M期でブロックする。25943の発現はまた、ノコダゾールを用いた同調の後、DL D1細胞においてアップレギュレートされた。

20

【0261】

ヒト25943の発現を、インビトロ結腸癌モデルにおいてさらに調べた(表8および表10)。DL D1結腸癌細胞(表8中のサンプル2~4(サンプル1と比較して);表10中のサンプル16~18(サンプル14と比較して))およびHCT116細胞(表8中のサンプル6~9(サンプル5と比較して);表10中のサンプル19~22(サンプル15と比較して))におけるk-ras遺伝子の破壊は、25943の発現のダウンレギュレーションをもたらした。

30

【0262】

(実施例10: TaqManおよびインサイチュ分析を用いた、卵巣癌中でのヒト25943 mRNAの発現分析)

本実施例は、TaqManTM手順およびインサイチュハイブリダイゼーション分析(上記の通り)を用いて決定した場合の、種々の卵巣腫瘍および細胞株におけるヒト25943 mRNAの発現を記載する。

【0263】

(固形腫瘍)

ヒト25943の発現を、Taqman分析を用いて、固形ヒト卵巣腫瘍において調べた。表2に示すように、25943発現は、5/5の卵巣腫瘍において、正常卵巣と比較して、強くアップレギュレートされる。

40

【0264】

ヒト25943の発現を、インサイチュハイブリダイゼーション分析を用いて、固形ヒト卵巣腫瘍において調べた。正常卵巣と比較して強力な25943発現が、腺癌、腎臓明細胞癌、および漿液癌を含め、調べた全ての卵巣腫瘍型(合計、5/7の腫瘍)において見られた。

【0265】

(TaqMan—細胞株および腫瘍モデル)

50

ヒト 25943 の発現を、種々の卵巣腫瘍モデルにおいて調べた。表 11 に示すように、25943 発現は、増殖因子 EGF (サンプル 2~4 (サンプル 1 と比較して)) およびヒレグリン (サンプル 4~6 (サンプル 1 と比較して)) に応答して、血清の非存在下で、卵巣癌細胞株 SKOV3 において、ダウンレギュレートされる。シスプラチン耐性 SKOV-3 改変体は、EGF (サンプル 8 および 10~12) については同様のダウンレギュレーションを示すが、ヒレグリン (サンプル 8 および 13~15) については示さない。このデータは、25943 発現が、上皮増殖因子レセプター (EGFR) ファミリーを通して調節され得ることを示す。上皮増殖因子レセプターファミリーは、EGFR、Her2、Her3 および Her4 を包含する。

【0266】

10

ヒト 25943 の発現をまた、異種移植に好都合な卵巣腫瘍細胞株および他の卵巣腫瘍細胞株において調べた。表 3 および表 4 に示すように、25943 は、SKOV-3 細胞および OVCA R-3 細胞において高度に発現される。表 11 に示すように、25943 は、SKOV-3 細胞、シスプラチン耐性 SKOV-3 改変体細胞、A2780 細胞、OVCA R-3 細胞、MDA2774 細胞、および DOV13 細胞において高度に発現される。

【0267】

ヒト 25943 の発現を、血清処理HEY卵巣癌細胞においてさらに調べた。この細胞を、24 時間にわたって血清飢餓にし、そして 10% 血清の添加後、時間点を 0 時間、1 時間、3 時間、6 時間、9 時間および 12 時間の時点に取った。c-myc タンパク質は、血清添加後 1 時間において高度にアップレギュレートされ、そして 6 時間目にリン酸化される。表 11 のサンプル 28~33 に示すように、25943 発現は、処置後 1 時間と 3 時間との間でアップレギュレートされ、次いで、6 時間と 12 時間との間でダウンレギュレートされる。このことは、c-myc による調節を示す。

20

【0268】

ヒト 25943 の発現をまた、ヌードマウスにおける、SKOV-3 およびシスプラチン耐性 SKOV-3 改変体の皮下異種移植片腫瘍において調べた。表 11 (サンプル 34~37) に示すように、25943 発現は、これらの腫瘍において、プラスチック上で増殖させた親細胞と比較して、強くダウンレギュレートされる。

【0269】

30

最終的に、ヒト 25943 の 25943 発現は、1/2 の卵巣腹水サンプルにおいて、正常卵巣と比較して、アップレギュレートされる (表 11、サンプル 38~41)。

【0270】

(実施例 11: TaqMan およびインサイチュ分析を用いた、肺癌におけるヒト 25943 mRNA の発現分析)

本実施例は、TaqManTM 手順およびインサイチュハイブリダイゼーション分析 (上記の通り) を用いて決定した場合の、種々の肺腫瘍および細胞株におけるヒト 25943 mRNA の発現を記載する。

【0271】

(固形腫瘍)

40

ヒト 25943 の発現を、Taqman 分析を用いて、固形ヒト肺腫瘍において調べた。表 2 に示すように、25943 発現は、4/6 の肺腫瘍において、正常肺と比較して、アップレギュレートされる。25943 発現はまた、肝臓への結腸転移物においても、正常肝臓と比較して、アップレギュレートされる。

【0272】

ヒト 25943 の発現を、インサイチュハイブリダイゼーション分析を用いて、固形ヒト肺腫瘍において調べた。正常肺と比較して中程度の 25943 発現が、2/2 の肺腫瘍において見られた。

【0273】

(TaqMan-細胞株および腫瘍モデル)

50

ヒト 25943 の発現を、異種移植に好都合な肺腫瘍細胞株において調べた。表 3 および表 4 に示すように、25943 は、NCIH125 細胞、NCIH67 細胞、A549 細胞、および正常ヒト気管支上皮細胞 (NHBE) において高度に発現される。

【0274】

(実施例 12: TaqMan およびインサイチュ分析を用いた、乳癌におけるヒト 25943 mRNA の発現分析)

本実施例は、TaqManTM 手順およびインサイチュハイブリダイゼーション分析 (上記の通り) を用いて決定した場合の、種々の胸部腫瘍および細胞株におけるヒト 25943 mRNA の発現を記載する。

【0275】

10

(固形腫瘍)

ヒト 25943 の発現を、インサイチュハイブリダイゼーション分析を用いて、固形ヒト胸部腫瘍において調べた。正常胸部と比較して中程度の 25943 発現が、2/2 の胸部腫瘍 (侵襲性腺管癌) において見られた。

【0276】

(TaqMan-細胞株および腫瘍モデル)

ヒト 25943 の発現を、異種移植に好都合な胸部腫瘍細胞株において調べた。表 3 および表 4 に示すように、25943 は、MCF-7 細胞、ZR75 細胞、T47D 細胞、および SkBr3 細胞において高度に発現される。

【0277】

20

(等価物)

当業者は、慣用実験にすぎない実験を用いて、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するかまたは確認し得る。このような等価物は、特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/038113 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
(21) International Application Number: PCT/US02/34730
(22) International Filing Date: 29 October 2002 (29.10.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 60/335,004 31 October 2001 (31.10.2001) US
(71) Applicant (for all designated States except US): MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WILLIAMSON, Mark [US/US]; 15 Stonecrest Drive, Saugus, MA 01906 (US); RUDOLPH-OWEN, Laura, A. [US/US]; 186 Arborway, Apt. 1, Jamaica Plain, MA 02130 (US).
(74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Millennium Pharmaceuticals, Inc., 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, 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, LI, 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: — 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 03/038113 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS USING 25943

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the treatment and diagnosis of cellular proliferation disorders, including, but not limited to, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and colon cancer. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a cellular proliferation disorders disorder or modulating cellular proliferation. The invention also provides a method for modulating cellular proliferation e.g., modulating cellular proliferation in a subject. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 25943 polypeptide activity or aberrant 25943 nucleic acid expression.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND
DIAGNOSIS OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS USING 25943**

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/335,004,
5 filed October 31, 2001, the entire contents of which are herein incorporated by reference.

Colorectal cancer is the fourth most common cancer worldwide and the second
most common cause of cancer deaths. Within the United States alone, there will be over
150,000 new cases and 55,000 deaths this year. In fact, it is postulated that 50% of the
Western population will develop a colorectal tumor by the age of 70, with 10% of these
10 tumors progressing to malignancy. Despite advances in therapeutic treatment, the
prognosis remains poor, with only a five-year survival rate around 45%. Although the
progression of the disease has been well characterized (areas of dysplasia within the colon
develop into polyps, which eventually have the potential to become adenocarcinomas;
adenocarcinomas become invasive and metastasize to various regions of the body,
15 predominately the liver), diagnosis is primarily made during later stages of the disease.

Ovarian cancer, the deadliest of the gynecologic cancers, is the fifth leading cause
of cancer death among U.S. women; an estimated 13,900 American women will die from
ovarian cancer in 2001. Ovarian cancer occurs in one out of 55 women, and the number of
women diagnosed with the disease is projected to increase slightly, from 23,100 new cases
20 in 2000 to 23,400 expected cases in 2001. Currently, 50 percent of the women diagnosed
with ovarian cancer die from it within five years. When detected early, ovarian cancer is
very treatable, but the vast majority of cases are not diagnosed until the cancer has spread
beyond the ovaries. For example, in cases where ovarian cancer is detected before it has
spread beyond the ovaries, more than 90 percent of women will survive longer than five
25 years. However, only 25 percent of ovarian cancer cases in the U.S. are diagnosed in the
beginning stages; when diagnosed in advanced stages, the chance of five-year survival is
only about 25 percent. Ovarian cancer may be difficult to diagnose because symptoms are
easily confused with other diseases, and because there is no reliable, easy-to-administer
screening tool.

30 Lung cancer is among the most common cancers in the Western world. In the
United States, there were approximately 170,000 new cases of lung cancer in 1999. Since
the mid-1990s, about 150,000 Americans have died each year from this disease. Lung
cancer is the leading category of cancer death in men, and - since the late 1980s - it has
surpassed breast cancer as the leading category of cancer death in women. Findings from

WO 03/038113

PCT/US02/34730

the U.S. National Cancer Institute (NCI) indicate that the upward trend in cancer-related death is due to the rapidly increasing rate of lung cancer mortality. Statistical projections suggest that lung cancer mortality in this decade will continue to rise to a rate of over 50 deaths per year per 100,000 population in America. Current lung cancer prevention
5 programs are not expected to influence lung cancer death rates until after the year 2000. There is a close relationship between the number of lung cancer cases and lung cancer deaths in America. This is because of the low 5-year survival rate for this disease. Although lung cancer survival rates have improved over the last 40 years, the percentage (approximately 13%) continues to be low in comparison to other cancers.

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

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and
15 treatment of cellular proliferation disorders. The present invention is based, at least in part, on the discovery that expression of the 25943 gene (a glycosylasparaginase) is upregulated in tumors (*e.g.*, ovarian, lung, breast, and colon tumors). The present invention is further based, at least in part, on the discovery that 25943 expression is regulated during the cell cycle. The invention is still further based, at least in part, on the
20 discovery that 25943 may be involved in the post-translational modification and processing of proteins. Without intending to be limited by mechanism, it is believed that modulation, *e.g.*, inhibition, of 25943 activity may modulate, *e.g.*, inhibit, protein modulation (*e.g.*, post-translational modification and process) in tumor cells that is relevant to their tumorigenic potential, therefore, modulating, *e.g.*, inhibiting cellular
25 proliferation and tumorigenesis.

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

In one aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable
30 of treating a cellular proliferation disorder, *e.g.*, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and colon cancer. The method includes assaying the ability of the compound to modulate 25943 nucleic acid expression or 25943 polypeptide activity. In one embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 25943 polypeptide activity is determined by detecting the glycosylasparaginase activity of a cell. In another

WO 03/038113

PCT/US02/34730

embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 25943 polypeptide activity is determined by detecting modulation of cellular proliferation in a cell.

5 In another aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of modulating cellular proliferation. The method includes contacting a cell expressing a 25943 nucleic acid or polypeptide (*e.g.*, a breast cell, a breast tumor cell, an ovary cell, an ovarian tumor cell, a lung cell, a lung tumor cell, a colon cell, and/or a colon tumor cell) with a test compound and assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 25943 nucleic acid or the activity of a 25943 polypeptide.

10 In a further aspect, the invention features a method for modulating cellular proliferation. The method includes contacting a cell (*e.g.*, a breast cell, a breast tumor cell, an ovary cell, an ovarian tumor cell, a lung cell, a lung tumor cell, a colon cell, and/or a colon tumor cell) with a 25943 modulator, for example, an anti-25943 antibody, a 25943 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, a 25943 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent
15 identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a small molecule, an antisense 25943 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof, or a ribozyme.

20 In yet another aspect, the invention features a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder, *e.g.*, a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 25943 polypeptide activity or aberrant 25943 nucleic acid expression, such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and colon cancer. The method includes administering to the subject a therapeutically effective amount of a 25943 modulator, *e.g.*,
25 in a pharmaceutically acceptable formulation or by using a gene therapy vector. In one embodiment, the 25943 modulator may be a small molecule, an anti-25943 antibody, a 25943 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, a 25943 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally
30 occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an antisense 25943 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof, or a ribozyme.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

In another aspect, the invention provides a method for modulating, *e.g.*, increasing or decreasing, cellular proliferation in a subject by administering to the subject a 25943 modulator.

In another embodiment, the invention provides a 25943 nucleic acid molecule
 5 which is at least 81%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% or more identical to the nucleotide sequence (*e.g.*, to the entire length of the nucleotide sequence) shown in SEQ ID NO:1 or 3, or a complement thereof.

In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule includes the
 10 nucleotide sequence shown SEQ ID NO:1 or 3, or a complement thereof. In another preferred embodiment, the nucleic acid molecule consists of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 3. In another preferred embodiment, the nucleic acid molecule includes a fragment of at least 1045, 1046, 1047, 1050, 1075, 1100, 1200, 1300, 1350 or more nucleotides (*e.g.*, contiguous nucleotides) of the nucleotide sequence of SEQ ID
 15 NO:1 or 3, or a complement thereof.

In another embodiment, an 25943 nucleic acid molecule includes a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence sufficiently identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. In a preferred embodiment, a 25943 nucleic acid molecule includes a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid
 20 sequence at least 76%, 77%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% or more identical to the entire length of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

In another preferred embodiment, an isolated nucleic acid molecule encodes the amino acid sequence of human 25943. In yet another preferred embodiment, the nucleic
 25 acid molecule includes a nucleotide sequence encoding a protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2

In other preferred embodiments, the nucleic acid molecule encodes a naturally occurring allelic variant of a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the nucleic acid molecule hybridizes to a complement of a nucleic acid
 30 molecule comprising SEQ ID NO:1 or 3 under stringent conditions.

Another aspect of this invention features isolated or recombinant 25943 proteins and polypeptides. In a preferred embodiment, the 25943 protein family member has an amino acid sequence at least about 76%, 77%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

WO 03/038113

PCT/US02/34730

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% or more identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

In yet another preferred embodiment, the 25943 protein family member is encoded by a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence which hybridizes under stringent hybridization conditions to a complement of a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 3.

In another embodiment, the invention features fragments of the protein having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the fragment comprises at least 232, 233, 234, 250, 275, or 300 amino acids (*e.g.*, contiguous amino acids) of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. In another embodiment, the protein, preferably a 25943 protein, has the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

In another embodiment, the invention features an isolated 25943 protein family member which is encoded by a nucleic acid molecule consisting of a nucleotide sequence at least about 81%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% or more identical to a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 3, or a complement thereof. This invention further features an isolated protein, preferably a 25943 protein, which is encoded by a nucleic acid molecule consisting of a nucleotide sequence which hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule comprising a complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 3.

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

Table 1 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various human cell types and tissues, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) normal artery; (2) diseased aorta; (3) normal vein; (4) coronary smooth muscle cells; (5) human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); (6) normal heart; (7) heart (congestive heart failure); (8) kidney; (9) skeletal muscle; (10) normal adipose tissue; (11) pancreas; (12) primary osteoblasts; (13) differentiated osteoclasts; (14) normal skin; (15) normal spinal cord; (16) normal brain cortex; (17) normal brain hypothalamus; (18) nerve; (19) dorsal root ganglion; (20) normal breast; (21) breast tumor; (22) normal ovary; (23) ovarian tumor; (24) normal prostate; (25) prostate tumor; (26) salivary gland; (27) normal colon; (28) colon tumor; (29) lung tumor; (30) lung (chronic obstructive pulmonary disease); (31) colon (inflammatory bowel disease); (32) normal liver; (33) liver fibrosis; (34) normal spleen; (35) normal tonsil; (36) normal lymph node; (37) normal small intestine; (38)

WO 03/038113

PCT/US02/34730

macrophages; (39) synovium; (40) activated peripheral blood mononuclear cells; (41) neutrophils; (42) megakaryocytes; (43) erythroid cells; (44) positive control.

Table 2 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various human tumors, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1-3) normal breast; (4) breast tumor (MD-IDC); (5) breast tumor; (6) breast tumor (PD-); (7) breast tumor (IDC); (8) breast tumor (ILC (LG)); (9) lymph; (10) lung (breast metastasis); (11-12) normal ovary; (13-17) ovary tumor; (18-20) normal lung; (21) lung tumor (SmC); (22-23) lung tumor (PDNSCC); (24) lung tumor (SCC); (25-26) lung tumor (ACA); (27-29) normal colon; (30-31) colon tumor (MD); (32) colon tumor; (33) colon tumor (MD-PD); (34-35) colon tumor - liver metastasis; (36) normal liver (female); (37-38) cervix - squamous cell carcinoma; (39) human microvascular endothelial cells (HMVECs) - arrested; (40) human microvascular endothelial cells (HMVECs) - proliferating; (41) hemangioma; (42) HCT116 cells - normoxic; (43) HCT116 cells - hypoxic.

Table 3 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various xenograft (tumorigenic) cell lines, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) MCF-7 breast tumor; (2) ZR75 breast tumor; (3) T47D breast tumor; (4) MDA 231 breast tumor; (5) MDA 435 breast tumor; (6) SKBr3 breast tumor; (7) DLD 1 colon tumor (stage C); (8) SW480 colon tumor (stage B); (9) SW620 colon tumor (stage C); (10) HCT 116 colon tumor; (11) HT29 colon tumor; (12) colo 205 colon tumor; (13) NCIH125 lung tumor; (14) NCIH67 lung tumor; (15) NCIH322 lung tumor; (16) NCIH460 lung tumor; (17) A549 lung tumor; (18) normal human bronchial epithelium (NHBE); (19) SKOV-3 ovary tumor; (20) OVCAR-3 ovary tumor; (21) 293 baby kidney cells; (22) 293T baby kidney cells.

Table 4 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various xenograft (tumorigenic) cell lines, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) MCF-7 breast tumor; (2) ZR75 breast tumor; (3) T47D breast tumor; (4) MDA 231 breast tumor; (5) MDA 435 breast tumor; (6) SKBr3 breast tumor; (7) DLD 1 colon tumor (stage C); (8) SW480 colon tumor (stage B); (9) SW620 colon tumor (stage C); (10) HCT 116 colon tumor; (11) HT29 colon tumor; (12) colo 205 colon tumor; (13) NCIH125 colon tumor; (14) NCIH67 colon tumor; (15) NCIH322 colon tumor; (16) NCIH460 colon tumor; (17) A549 colon tumor; (18) normal human bronchial epithelium (NHBE); (19) SKOV-3 ovary tumor; (20) OVCAR-3 ovary tumor; (21) 293 baby kidney cells; (22) 293T baby kidney cells.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Table 5 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various staged colon tumors, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1-5) normal colon; (6-7) adenomas; (8-12) colonic ACA-B; (13-18) colonic ACA-C; (19-24) normal liver; (25-30) liver metastasis.

5 *Table 6* depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various staged colon tumors, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1-5) normal colon; (6-7) adenomas; (8-12) colonic ACA-B; (13-18) colonic ACA-C; (19-24) normal liver; (25-30) liver metastasis.

10 *Table 7* depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various colon metastases, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1-3) normal colon; (4-5) colonic ACA-C; (6) colonic ACA-B; (7) adenocarcinoma; (8-24) colon metastasis to the liver; (25-27) normal liver.

Table 8 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in a k-ras disrupted DLD-1 and HCT116 colon tumor cells, as determined by Taqman analysis. Sample No.:
15 (1-4) DLD-1; (5-9) HCT-116 cells.

Table 9 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in synchronized tumor cells induced to progress through the cell cycle, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) HCT116, aphidicolin, t = 0; (2) HCT116, aphidicolin, t = 3; (3) HCT116, aphidicolin, t = 6; (4) HCT116, aphidicolin, t = 9; (5) HCT116, aphidicolin, t = 12; (6) HCT116, aphidicolin, t = 15; (7) HCT116, aphidicolin, t = 18; (8) HCT116, aphidicolin, t = 21; (9) HCT116, aphidicolin, t = 24; (10) HCT116, nocodazole, t = 0; (11) HCT116, nocodazole, t = 3; (12) HCT116, nocodazole, t = 6; (13) HCT116, nocodazole, t = 9; (14) HCT116, nocodazole, t = 15; (15) HCT116, nocodazole, t = 18; (16) HCT116, nocodazole, t = 21; (17) HCT116, nocodazole, t = 24; (18) DLD, nocodazole, t = 3; (19) DLD, nocodazole, t = 6; (20) DLD, nocodazole, t = 9; (21) DLD, nocodazole, t = 12; (22) DLD, nocodazole, t = 15; (23) DLD, nocodazole, t = 18; (24) DLD, nocodazole, t = 21; (25) A549, mimo, t = 0; (26) A549, mimo, t = 3; (27) A549, mimo, t = 6; (28) A549, mimo, t = 9; (29) A549, mimo, t = 15; (30) A549, mimo, t = 18; (31) A549, mimo, t = 21; (32) A549, mimo, t = 24; (33) MCF10A, mimo, t = 0; (34) MCF10A, mimo, t = 3; (35) MCF10A, mimo, t = 6; (36) MCF10A, mimo, t = 9; (37) MCF10A, mimo, t = 12; (38) MCF10A, mimo, t = 18; (39) MCF10A, mimo, t = 21; (40) MCF10A, mimo, t = 24.

Table 10 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various *in vitro* oncogene cell models, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) SMAD4-SW480 control; (2) SMAD4-SW480 24 hours; (3) SMAD4-SW480 48 hours; (4) SMAD4-

WO 03/038113

PCT/US02/34730

- SW480 72 hours; (5) L51747 mucinous; (6) HT29 non-mucinous; (7) SW620 non-mucinous; (8) CSC-1 normal; (9) NCM-260 normal; (10) HCT116 RER+; (11) SW48 RER+; (12) SW480 RER -/-; (13) CACO RER -/-; (14) JDLD-1; (15) JHCT116; (16) DKO1; (17) DKO4; (18) DKS-8; (19) Hke3; (20) HKh2; (21) HK2-6; (22) e3Ham#9; (23) APC5 -/-; (24) APC6 -/-; (25) APC1 +/-; (26) APC13 +/-

- Table 11 depicts the expression levels of human 25943 mRNA in various ovarian cell tumor models, as determined by Taqman analysis. Sample No.: (1) SKOV-3, no growth factors; (2) SKOV-3, EGF 15'; (3) SKOV-3, EGF 30'; (4) SKOV-3, EGF 60'; (5) SKOV-3, Hrg 15'; (6) SKOV-3, Hrg 30'; (7) SKOV-3, Hrg 60'; (8) SKOV-3var, no growth factors; (9) SKOV-3var, serum 30'; (10) SKOV-3var, EGF 15'; (11) SKOV-3var, EGF 30'; (12) SKOV-3var, EGF 60'; (13) SKOV-3var, Hrg 15'; (14) SKOV-3var, Hrg 30'; (15) SKOV-3var, Hrg 60'; (16) HEY plastic; (17) HEY soft agar; (18) SKOV-3; (19) SKOV-3var; (20) A2780; (21) A2780-ADR; (22) OVCAR-3; (23) OVCAR-4; (24) MDA2774; (25) DOV13; (26) Caov-3; (27) ES-2; (28) HEY 0 hours; (29) HEY 1 hour; (30) HEY 3 hours; (31) HEY 6 hours; (32) HEY 9 hours; (33) HEY 12 hours; (34) SKOV-3 plastic; (35) SKOV-3 SubQ tumor; (36) SKOV-3 variant, plastic; (37) SKOV-3 var, SubQ tumor; (38) normal ovary; (39) normal ovary; (40) ovarian ascites; (41) ovarian ascites.

Table 1:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	Artery normal	8.4607
2	Aorta diseased	10.4164
3	Vein normal	1.7542
4	Coronary SMC	0
5	HUVEC	341.5101
6	Heart normal	35.1581
7	Heart CHF	12.2591
8	Kidney	197.5103
9	Skeletal Muscle	24.8034
10	Adipose normal	4.6293
11	Pancreas	58.924
12	primary osteoblasts	0.269
13	Osteoclasts (diff)	1.8035
14	Skin normal	282.2411

WO 03/038113

PCT/US02/34730

15	Spinal cord normal	116.6291
16	Brain Cortex normal	2313.3764
17	Brain Hypothalamus normal	1500.039
18	Nerve	110.7209
19	DRG (Dorsal Root Ganglion)	119.908
20	Breast normal	9.7526
21	Breast tumor	6.7776
22	Ovary normal	26.278
23	Ovary Tumor	347.4796
24	Prostate Normal	147.6241
25	Prostate Tumor	144.0858
26	Salivary glands	10.0965
27	Colon normal	11.5577
28	Colon Tumor	62.5
29	Lung tumor	198.196
30	Lung COPD	22.2508
31	Colon IBD	58.517
32	Liver normal	30.9268
33	Liver fibrosis	8.5196
34	Spleen normal	1.3668
35	Tonsil normal	3.6195
36	Lymph node normal	4.1433
37	Small intestine normal	7.1146
38	Macrophages	1.3907
39	Synovium	0.7478
40	Activated PBMC	0.9698
41	Neutrophils	43.1349
42	Megakaryocytes	65.3803
43	Erythroid	181.1178
44	positive control	1337.9276

Table 2:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	PIT 400 Breast N	3.17
2	PIT 372 Breast N	3.40
3	CHT 1228 Breast Normal	0.84
4	MDA 304 Breast T: MD-IDC	0.55
5	CHT 2002 Breast T: IDC	2.22

WO 03/038113

PCT/US02/34730

6	MDA 236-Breast T:PD-IDC(ILC?)	0.17
7	CHT 562 Breast T: IDC	0.52
8	NDR 136 Breast T: ILC (LG)	0.36
9	CHT 1841 Lymph node (Breast met)	0.00
10	PIT 58 Lung (Breast met)	13.28
11	CHT 620 Ovary N	0.37
12	PIT 208 Ovary N	10.34
13	CLN 012 Ovary T	141.61
14	CLN 07 Ovary T	216.13
15	CLN 17 Ovary T	248.27
16	MDA 25 Ovary T	458.50
17	CLN 08 Ovary T	104.39
18	MDA 185 Lung N	7.14
19	PIT 298 Lung N	4.52
20	CLN 930 Lung N	8.82
21	MPI 215 Lung T-SmC	95.06
22	MDA 259 Lung T-PDNSCCL	88.08
23	CHT 832 Lung T-PDNSCCL	10.17
24	MDA 262 Lung T-SCC	18.58
25	CHT 793 Lung T-ACA	10.06
26	CHT 331 Lung T-ACA	15.68
27	CHT 405 Colon N	3.64
28	CHT 523 Colon N	3.42
29	CHT 371 Colon N	1.10
30	CHT 382 Colon T: MD	24.77
31	CHT 528 Colon T: MD	30.40
32	CLN 609 Colon T	1.41
33	NDR 210 Colon T: MD-PD	13.51
34	CHT 340 Colon-Liver Met	4.98
35	CHT 1637Colon-Liver Met	0.74
36	PIT 260 Liver N (female)	1.75
37	CHT 1653 Cervix Squamous CC	6.41
38	CHT 569 Cervix Squamous CC	0.25
39	A24 HMVEC-Arr	2.71
40	C48 HMVEC-Prol	2.85
41	Pooled Hemangiomas	0.12
42	HCT116N22 Normoxic	36.27

WO 03/038113

PCT/US02/34730

43	HCT116H22 Hypoxic	20.05
----	-------------------	-------

Table 3:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	MCF-7 Breast T	25.56
2	ZR75 Breast T	14.48
3	T47D Breast T	11.40
4	MDA 231 Breast T	2.36
5	MDA 435 Breast T	2.65
6	SKBr3 Breast	10.86
7	DLD 1 ColonT (stageC)	57.31
8	SW480 Colon T (stage B)	2.88
9	SW620 ColonT (stageC)	13.23
10	HCT116	5.58
11	HT29	0.64
12	Colo 205	0.46
13	NCIH125	9.52
14	NCIH67	6.32
15	NCIH322	18.58
16	NCIH460	3.92
17	A549	10.10
18	NHBE	19.85
19	SKOV-3 ovary	4.06
20	OVCAR-3 ovary	11.84
21	293 Baby Kidney	27.30
22	293T Baby Kidney	44.66

Table 4:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	MCF-7 Breast T	20.83
2	ZR75 Breast T	6.15
3	T47D Breast T	8.97
4	MDA 231 Breast T	0.29
5	MDA 435 Breast T	0.54
6	SKBr3 Breast	20.40
7	DLD 1 ColonT (stageC)	9.82
8	SW480 Colon T (stage B)	6.92

WO 03/038113

PCT/US02/34730

9	SW620 ColonT (stageC)	41.67
10	HCT116	26.01
11	HT29	3.04
12	Colo 205	1.44
13	NCIH125	12.05
14	NCIH67	458.50
15	NCIH322	6.11
16	NCIH460	3.27
17	A549	26.46
18	NHBE	0.00
19	SKOV-3 ovary	191.44
20	OVCAR-3 ovary	39.97
21	293 Baby Kidney	150.73
22	293T Baby Kidney	172.54

Table 5:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	CHT 410 Colon N	1.59
2	CHT 425 Colon N	1.68
3	CHT 371 Colon N	0.16
4	PJT 281 Colon N	1.53
5	NDR 211 Colon N	0.40
6	CHT 122 Adenomas	3.33
7	CHT 887 Adenomas	10.20
8	CHT 414 Colonic ACA-B	2.13
9	CHT 841 Colonic ACA-B	0.39
10	CHT 890 Colonic ACA-B	1.67
11	CHT 910 Colonic ACA-B	6.78
12	CHT 377 Colonic ACA-B	0.48
13	CHT 520 Colonic ACA-C	1.89
14	CHT 596 Colonic ACA-C	2.09
15	CHT 907 Colonic ACA-C	5.08
16	CHT 372 Colonic ACA-C	7.57
17	NDR 210 Colonic ACA-C	0.21
18	CHT 1385 Colonic ACA-C	0.65
19	CLN 740 Liver N	0.19
20	CLN 741 Liver N	0.35
21	NDR 165 Liver N	0.81

WO 03/038113

PCT/US02/34730

22	NDR 150 Liver N	1.11
23	PIT 236 Liver N	1.04
24	CHT 1878 Liver N	1.30
25	CHT 119 Col Liver Met	13.32
26	CHT 131 Col Liver Met	0.95
27	CHT 218 Col Liver Met	1.21
28	CHT 739 Col Liver Met	0.84
29	CHT 755 Col Liver Met	0.61
30	CHT 215 Col Abdominal	2.13
	Met	

Table 6:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	CHT 410 Colon N	0.94
2	CHT 425 Colon N	0.80
3	CHT 371 Colon N	0.09
4	PIT 281 Colon N	0.79
5	NDR 211 Colon N	0.18
6	CHT 122 Adenomas	2.08
7	CHT 887 Adenomas	6.82
8	CHT 414 Colonic ACA-B	1.21
9	CHT 841 Colonic ACA-B	0.20
10	CHT 890 Colonic ACA-B	0.85
11	CHT 910 Colonic ACA-B	3.26
12	CHT 377 Colonic ACA-B	0.21
13	CHT 520 Colonic ACA-C	1.13
14	CHT 596 Colonic ACA-C	1.12
15	CHT 907 Colonic ACA-C	4.68
16	CHT 372 Colonic ACA-C	4.71
17	NDR 210 Colonic ACA-C	0.09
18	CHT 1365 Colonic ACA-C	0.32
19	CLN 740 Liver N	0.00
20	CLN 741 Liver N	0.17
21	NDR 165 Liver N	0.44
22	NDR 150 Liver N	0.47
23	PIT 236 Liver N	0.00
24	CHT 1878 Liver N	0.49
25	CHT 119 Col Liver Met	8.14

WO 03/038113

PCT/US02/34730

26	CHT 131 Col Liver Met	0.38
27	CHT 218 Col Liver Met	0.47
28	CHT 739 Col Liver Met	0.40
29	CHT 755 Col Liver Met	0.27
30	CHT 215 Col Abdominal Met	0.50

Table 7:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	CHT 371 Colon N	0.02
2	CHT 523 Colon N	0.24
3	NDR 104 Colon N	1.88
4	CHT 520 Colonic ACA-C	0.77
5	CHT 1365 Colonic ACA-C	0.11
6	CHT 382 Colonic ACA-B	0.42
7	CHT 122 Adenocarcinoma	8.34
8	CHT 077 Liver-Colon Mets	2.42
9	CHT 739 Liver-Colon Mets	0.06
10	CHT 755 Liver-Colon Mets	0.08
11	CHT001 Liver-Colon Mets	0.23
12	CHT 084 Liver-Colon Mets	0.17
13	CHT 113 Liver-Colon Mets	0.11
14	CHT 114 Liver-Colon Mets	1.32
15	CHT 127 Liver-Colon Mets	0.87
16	CHT 137 Liver-Colon Mets	115.82
17	CHT 218 Liver-Colon Mets	0.16
18	CHT 220 Liver-Colon Mets	0.17
19	CHT 324 Liver-Colon Mets	1.28
20	CHT 340 Liver-Colon Met	6.78
21	CHT 530 Liver-Colon Met	0.18
22	CHT 849 Liver-Colon Met	7.02
23	CHT 1637 Liver-Colon Met	0.31
24	CHT131 Liver-Colon Met	0.38
25	NDR 165 Liver Normal	0.51
26	NDR 150 Liver Normal	0.55
27	PIT 236 Liver Normal	0.46

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Table 8:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	JDLD-1	61.21
2	DKO1	31.14
3	DKS-8	21.20
4	DKO4	6.68
5	JHCT116	69.35
6	HK2-6	59.95
7	HKe3	25.38
8	HKh2	23.77
9	e3Ham#9	29.46

Table 9:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	HCT 116 Aphidl t=0	29.16
2	HCT 116 Aphidl t=3	30.19
3	HCT 116 Aphidl t=6	27.39
4	HCT 116 Aphidl t=9	28.19
5	HCT 116 Aphidl t=12	24.86
6	HCT 116 Aphidl t=15	15.20
7	HCT 116 Aphidl t=18	25.74
8	HCT 116 Aphidl t=21	26.37
9	HCT 116 Aphidl t=24	19.51
10	HCT 116 Noc t=0	26.37
11	HCT 116 Noc t=3	20.91
12	HCT 116 Noc t=6	22.72
13	HCT 116 Noc t=9	26.74
14	HCT 116 Noc t=15	30.50
15	HCT 116 Noc t=18	44.19
16	HCT 116 Noc t=21	46.55
17	HCT 116 Noc t=24	41.67
18	DLD noc t=3	44.97
19	DLD noc t=6	62.07
20	DLD noc t=9	79.94
21	DLD noc t=12	73.81
22	DLD noc t=15	99.79
23	DLD noc t=18	70.56

WO 03/038113

PCT/US02/34730

24	DLD noc t=21	74.58
25	A549 Mimo t=0	67.45
26	A549 Mimo t=3	62.28
27	A549 Mimo t=6	45.12
28	A549 Mimo t=9	41.67
29	A549 Mimo t=15	33.73
30	A549 Mimo t=18	29.56
31	A549 Mimo t=21	28.26
32	A549 Mimo t=24	27.97
33	MCF10A Mimo t=0	0.00
34	MCF10A Mimo t=3	0.00
35	MCF10A Mimo t=6	0.00
36	MCF10A Mimo t=9	0.00
37	MCF10A Mimo t=12	0.00
38	MCF10A Mimo t=18	0.00
39	MCF10A Mimo t=21	0.00
40	MCF10A Mimo t=24	0.00

Table 10:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	SMAD4-SW480 C	2.17
2	SMAD4-SW480 24HR	4.27
3	SMAD4-SW480 48HR	4.91
4	SMAD4-SW480 72HR	1.62
5	L51747-MUCINOUS	12.56
6	HT29 NON-MUCINOUS	3.66
7	SW620 NON-MUCINOUS	8.88
8	CSC-1 NORMAL	5.08
9	NCM-460 NORMAL	8.40
10	HCT116 RER+	14.89
11	SW48 RER+	20.69
12	SW480 RER-/-	9.82
13	CACO- RER-/-	4.89
14	JDLD-1	61.21
15	JHCT116	69.35
16	DKO1	31.14
17	DKO4	6.68
18	DKS-8	21.20

WO 03/038113

PCT/US02/34730

19	HKe3	25.38
20	HKh2	23.77
21	HK2-6	59.95
22	e3Ham#9	29.46
23	APC5 -/-	0.00
24	APC6 -/-	2.00
25	APC1+/-	0.31
26	APC13+/-	0.61

Table 11:

Sample Number	Tissue Type	Relative Expression
1	SKOV-3 Serum '30	71.1
2	SKOV-3 No GF	86.9
3	SKOV-3 EGF '15	82.8
4	SKOV-3 EGF '30	75.9
5	SKOV-3 EGF '60	66.3
6	SKOV-3 Hrg '15	64.9
7	SKOV-3 Hrg '30	63.4
8	SKOV-3 Hrg '60	67.9
9	SKOV-3var No GF	76.9
10	SKOV-3var Serum '30	98.8
11	SKOV-3var EGF '15	58.7
12	SKOV-3var EGF '30	60.2
13	SKOV-3var EGF '60	46.9
14	SKOV-3var Hrg 15'	62.3
15	SKOV-3var Hrg 30'	96.4
16	SKOV-3var Hrg 60'	71.8
17	HEY Plastic	0.6
18	HEY Soft Agar	0.0
19	SKOV-3	66.3
20	SKOV-3var	32.5
21	A2780	32.9
22	A2780-ADR	7.9
23	OVCAR-3	40.1
24	OVCAR-4	6.9
25	MDA2774	37.9
26	DOV13	17.8
27	Caov-3	6.7

WO 03/038113

PCT/US02/34730

28	ES-2	0.0
29	HEY 0hr	2.6
30	HEY 1hr	2.5
31	HEY 3hr	3.6
32	HEY 6hr	2.8
33	HEY 9hr	2.8
34	HEY 12hr	1.4
35	SKOV-3 Plastic	167.2
36	SKOV-3 SubQ Tumor	19.1
37	SKOV-3 Variant Plastic	135.8
38	SKOV-3 Var SubQ Tumor	1.5
39	MDA 127 Normal Ovary	0.3
40	MDA 224 Normal Ovary	0.1
41	MDA 124 Ovarian Ascites	0.2
42	MDA 126 Ovarian Ascites	53.8

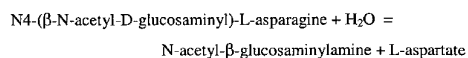
The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and treatment of cellular proliferation disorders, *e.g.*, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and/or colon cancer. The present invention is based, at least in part, on the discovery that expression of the 25943 gene (a glycosylasparaginase) is upregulated in tumors (*e.g.*, ovarian, lung, breast, and colon tumors). The present invention is further based, at least in part, on the discovery that 25943 expression is regulated during the cell cycle. The invention is still further based, at least in part, on the discovery that 25943 may be involved in the post-translational modification and processing of proteins. Without intending to be limited by mechanism, it is believed that modulation, *e.g.*, inhibition, of 25943 activity may modulate, *e.g.*, inhibit, protein modulation (*e.g.*, post-translational modification and process) in tumor cells that is relevant to their tumorigenic potential, therefore, modulating, *e.g.*, inhibiting cellular proliferation and tumorigenesis.

25943 is a member of a class of enzymes called glycosylasparaginases, which are involved in the degradation of glycoproteins, predominantly in the lysosomes. Generally, deficiencies in these types of enzymes cause the accumulation of partially degraded oligosaccharides and glycopeptides. Deficiencies in glycosylasparaginase, also referred to as aspartylglucosaminidase, result in the lysosomal storage disease known as Aspartylglucosaminuria. The glycosylasparaginase family of enzymes has multifunctional properties and wide substrate specificity. Glycosylasparaginases are responsible for catalyzing the cleavage of the protein-to-carbohydrate linkage of asparagine-linked

WO 03/038113

PCT/US02/34730

glycoproteins. Glycosylasparaginases can also catalyze the hydrolysis of β -aspartyl peptides to form aspartic acid and amino acids or peptides. Aspartate, a 4-carbon amino acid, is then transformed to oxaloacetate, which is used to begin the citric acid cycle, a major pathway for the generation of ATP and a provider of intermediates for the synthesis of amino acids. The general reaction that glycosylasparaginases catalyze is as follows:



The 25943 modulators identified according to the methods of the invention can be used to modulate cellular proliferation (*e.g.*, in breast, ovary, lung, and/or colon cells) and are, therefore, useful in treating, diagnosing, or prognosing cellular proliferation disorders. For example, inhibition of the activity of a 25943 molecule can inhibit cellular proliferation, thereby inhibiting tumorigenesis in the subject. Thus, the 25943 modulators identified using the assays described herein can be used to treat cellular proliferation disorders (*e.g.*, cancer) and/or disorders which are secondary to such disorders. Alternatively, 25943 modulators can increase cellular proliferation by increasing 25943 activity in a subject. Thus, 25943 modulators are also useful in the treatment of undesirable cell death, *e.g.*, neurodegenerative disorders.

As used herein, "cellular proliferation disorders" include those disorders that affect cellular proliferation, growth, apoptosis, differentiation, and/or migration processes. As used herein, a "cellular proliferation, growth, apoptosis, differentiation, and/or migration process" is a process by which a cell increases in number, size or content, by which a cell undergoes programmed cell death, by which a cell develops a specialized set of characteristics which differ from that of other cells, or by which a cell moves closer to or further from a particular location or stimulus. Examples of cellular proliferation disorders include cancer, *e.g.*, breast cancer, colon cancer, lung cancer, ovarian cancer, as well as other types of carcinomas, sarcomas, lymphomas, and/or leukemias; tumor angiogenesis and metastasis; skeletal dysplasia; hepatic disorders; and hematopoietic and/or myeloproliferative disorders. Other examples of disorders characterized by aberrant regulation of apoptosis include stroke-associated cell death and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, dementias related to Alzheimer's disease (such as

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Pick's disease), Parkinson's and other Lewy diffuse body diseases, senile dementia, and Huntington's disease.

As used interchangeably herein, "25943 activity," "biological activity of 25943" or "functional activity of 25943," includes an activity exerted by a 25943 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on a 25943 responsive cell or tissue (*e.g.*, breast, ovary, lung, or colon) or on a 25943 protein substrate, as determined *in vivo*, or *in vitro*, according to standard techniques. 25943 activity can be a direct activity, such as an association with a 25943-target molecule. As used herein, a "substrate" or "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a 25943 protein binds or interacts in nature, such that 25943-mediated function, *e.g.*, modulation of protein-carbohydrate linkage, is achieved. A 25943 target molecule can be a non-25943 molecule (*e.g.*, a carbohydrate-linked protein), or a 25943 protein or polypeptide. Examples of such target molecules include proteins in the same signaling path as the 25943 protein, *e.g.*, proteins which may function upstream (including both stimulators and inhibitors of activity) or downstream of the 25943 protein in a pathway involving regulation of cellular proliferation. Alternatively, a 25943 activity is an indirect activity, such as a cellular signaling activity mediated by interaction of the 25943 protein with a 25943 target molecule. The biological activities of 25943 are described herein. For example, the 25943 proteins can have one or more of the following activities: 1) they modulate hydrolysis of the protein-carbohydrate linkage of asparagine-linked glycoproteins; 2) they modulate hydrolysis of β -aspartyl peptides into aspartic acid and amino acids and/or peptides; 3) they modulate the citric acid cycle; 4) they modulate posttranslational modification and/or processing of proteins; and/or 5) they modulate cellular proliferation, growth, apoptosis, differentiation, and/or migration (*e.g.*, in breast, ovary, lung, and/or colon cells).

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

I. Screening Assays:

The invention provides methods (also referred to herein as "screening assays") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (*e.g.*, peptides, peptidomimetics, small molecules, ribozymes, or 25943 antisense molecules) which bind to 25943 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on 25943 expression or 25943 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of a 25943

WO 03/038113

PCT/US02/34730

target molecule. Compounds identified using the assays described herein may be useful for treating cellular proliferation disorders.

Candidate/test compounds include, for example, 1) peptides such as soluble peptides, including Ig-tailed fusion peptides and members of random peptide libraries (see, 5 *e.g.*, Lam, K.S. *et al.* (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten, R. *et al.* (1991) *Nature* 354:84-86) and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-configuration amino acids; 2) phosphopeptides (*e.g.*, members of random and partially degenerate, directed phosphopeptide libraries, see, *e.g.*, Songyang, Z. *et al.* (1993) *Cell* 72:767-778); 3) antibodies (*e.g.*, polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, 10 chimeric, and single chain antibodies as well as Fab, F(ab')₂, Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments of antibodies); and 4) small organic and inorganic molecules (*e.g.*, molecules obtained from combinatorial and natural product libraries).

The test compounds of the present invention can be obtained using any of the 15 numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches 20 are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145).

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 25 37:2678; Cho *et al.* (1993) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell *et al.* (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop *et al.* (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233.

Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner USP 5,223,409), spores (Ladner USP '409), 30 plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*

WO 03/038113

PCT/US02/34730

(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra.*).

In one aspect, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 25943 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate 25943 activity is determined. In a preferred embodiment, the biologically active portion of the 25943 protein includes a domain or motif which can modulate hydrolysis of a protein-carbohydrate linkage. Determining the ability of the test compound to modulate 25943 activity can be accomplished by monitoring, for example, the production of one or more specific metabolites (*e.g.*, free carbohydrate, Asn-GlcNAc, aspartic acid, amino acids, and/or peptides), by measuring expression of cell cycle regulatory genes, or by monitoring cellular proliferation. The cell, for example, can be of mammalian origin, *e.g.*, a breast cell, a lung cell, an ovary cell, or a colon cell.

The ability of the test compound to modulate 25943 binding to a substrate can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate 25943 binding to a substrate (*e.g.*, an Asn-linked glycoprotein) can be accomplished, for example, by coupling the 25943 substrate with a radioisotope, fluorescent, or enzymatic label such that binding of the 25943 substrate to 25943 can be determined by detecting the labeled 25943 substrate in a complex. Alternatively, 25943 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 25943 binding to a 25943 substrate in a complex. Determining the ability of the test compound to bind 25943 can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to 25943 can be determined by detecting the labeled 25943 compound in a complex. For example, 25943 substrates can be labeled with ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , or ^3H , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product.

It is also within the scope of this invention to determine the ability of a compound to interact with 25943 without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 25943 without the labeling of either the compound or the 25943 (McConnell, H.M. *et al.* (1992) *Science*

WO 03/038113

PCT/US02/34730

257:1906-1912). As used herein, a "microphysiometer" (e.g., Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and 25943.

5 Because 25943 expression is increased in tumors, including metastatic tumors, and is regulated during the cell cycle, compounds which modulate cellular proliferation can be identified by the ability to modulate 25943 expression. To determine whether a test compound modulates 25943 expression, a cell which expresses 25943 (e.g., a breast tumor cell, a lung tumor cell, an ovary tumor cell, a colon tumor cell, or a corresponding normal
10 cell) is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 25943 expression can be determined by measuring 25943 mRNA by, e.g., Northern Blotting, quantitative PCR (e.g., Taqman), or *in vitro* transcriptional assays. To perform an *in vitro* transcriptional assay, the full length promoter and enhancer of 25943 can be linked to a reporter gene such as chloramphenicol acetyltransferase (CAT) or luciferase
15 and introduced into host cells. The same host cells can then be transfected with or contacted with the test compound. The effect of the test compound can be measured by reporter gene activity and comparing it to reporter gene activity in cells which do not contain the test compound. An increase or decrease in reporter gene activity indicates a modulation of 25943 expression and is, therefore, an indicator of the ability of the test
20 compound to modulate cellular proliferation.

 The ability of the test compound to modulate 25943 expression can also be determined by measuring the glycosylasparaginase activity present in a cell contacted with a test compound. To determine whether a test compound modulates 25943
glycosylasparaginase activity, a cell which expresses 25943 (e.g., a breast tumor cell, a
25 lung tumor cell, an ovary tumor cell, a colon tumor cell, or a corresponding normal cell) is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 25943 glycosylasparaginase activity can be determined by measuring the level of GlcNAc, for example. Exemplary methods for measuring 25943 glycosylasparaginase activity are described in detail in Examples 4-7 and 9-10.

30 Cell lines transiently and stably transfected with tumor suppressors and oncogenes known to be associated with colon cancer progression may be useful in the methods of the invention for the identification of 25943 modulators (e.g., SW480 cells stably or transiently transfected with Smad4). Smad4 is a candidate tumor suppressor gene mutated in a subset of colon carcinomas. Smad4 functions in the signal transduction of TGF- β

WO 03/038113

PCT/US02/34730

molecules. It is well known that the TGF- β superfamily is involved in growth inhibition. Smad4 mutation/loss in colon cell lines provides the hypothesis that Smad4 may be a modulator of cell adhesion and invasion. Other cell lines useful in the methods of the invention are NCM425 cells stably or transiently transfected with β -catenin. Mutations of the APC gene are responsible for tumor formation in sporadic and familial forms of colorectal cancer. APC binds β -catenin and regulates the cytoplasmic levels of β -catenin. When APC is mutated, β -catenin accumulates in the cytoplasm and translocates into the nucleus. Once in the nucleus it interacts with LEF/TCF molecules and regulates gene expression. Genes regulated by the β -catenin/LEF complex, like c-myc and cyclin D1, are involved in tumorigenesis. Also useful in the methods of the invention are cells stably or transiently transfected with p53. p53 is a well known tumor suppressor which is mutated in >50% of colorectal cancer tumors.

Abnormalities in cell cycle regulation and its checkpoints lead to the development of malignant cells. The loss of a cell's ability to respond to signals that regulate cell proliferation and cell cycle arrest is a common mechanism of cancer. Accordingly, for the study of specific time point within the cell cycle, cell lines such as the colon cancer cell lines HCT116, DLD-1 and NCM425 may be synchronized with agents such as Aphidicolin (G1 block), Mimosine (G1 block) and Nocodazole (G2/M block).

Other cell lines useful in the methods of the invention included the colon cancer cell lines HCT116 and DLD1 with disrupted k-ras genes. Point mutations that activate the k-ras oncogene are found in 50% of human colon cancers. Activated k-ras may be regulating cell proliferation in colorectal tumors. Disrupting the activated k-ras allele in HCT116 and DLD1 cells morphologically alters differentiation, causes loss of anchorage independent growth, slows proliferation *in vitro* and *in vivo*, and reduces expression of c-myc. Still other cell lines useful in the methods of the invention include transient or stable transfections of WISP-1 into NCM425 colon cancer cells, transient or stable transfections of DCC, Cox2, and/or APC into various cells.

Assays that may be used to identify compounds that modulate 25943 activity also include assays that test for the ability of a compound to modulate cellular proliferation. The ability of a test compound to modulate cellular proliferation can be measured by its ability to modulate proliferation in a cell which expresses 25943, e.g., a breast, ovary, lung, or colon cell such as a breast, ovary, lung, or colon tumor cell. For example, the ability of a test compound to modulate cellular proliferation can be measured by contacting

WO 03/038113

PCT/US02/34730

a cell (*e.g.*, a breast, ovary, lung, or colon tumor cell) with the test compound, incubating the cell for a period of time, and measuring the number of cells present as compared to a control cell not contacted with the test compound. The number of cells can be measured, for example, by dry/wet weight measurement (see Example 1), by counting the cells via optical density (see Example 2), by using a counting chamber (see Example 3), or by using a Coulter Counter. The ability of a test compound to modulate cellular proliferation can also be measured by contacting a cell (*e.g.*, a breast, ovary, lung, or colon tumor cell) with the test compound and testing the ability of the cell to form a colony in soft agar (see Example 8). The ability of a cell to grow in soft agar indicates that it has lost the requirement for anchorage-dependant growth, which is an indication of tumorigenic potential. The ability of a test compound to modulate cellular proliferation may also be measured by contacting a cell (*e.g.*, a breast, ovary, lung, or colon tumor cell) with the test compound and testing the ability of the cell to form a tumor in a nude mouse. The nude mouse, a hairless mutant discovered in 1962, is immunodeficient, and thus does not reject tumor transplantations from other species.

Numerous other methods exist in the art to measure cellular proliferation.

Examples include measurement of the metabolic activity of viable cells via WST-8 reduction to formazan salt using a colorimetric assay (Cell Counting Kit-8 from Alexis Biochemicals, San Diego, CA or from Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); measurement of DNA synthesis by BrdU incorporation using an anti-BrdU monoclonal antibody/horseradish peroxidase-based detection system (Cell Proliferation ELISA or Immunocytochemistry from Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); DNA synthesis by [¹⁴C]thymidine uptake (Thymidine Uptake [¹⁴C] Cytostar-T Assay from Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); and DNA synthesis measured by scintillation proximity assay (SPA) of [³H]thymidine incorporation ([³H]Thymidine Uptake Assay Kit from Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Further examples of methods for measuring cellular proliferation include measurement of simultaneous cell surface markers and intracellular BrdU incorporation (FastImmune Anti-BrdU with DNase from BD Biosciences, San Jose, CA); measurement of the metabolic activity of viable cells via WST-1 reduction to soluble formazan salt using a colorimetric assay (Quick Cell Proliferation Assay Kit from BioVision, Inc., Mountain View, CA; Cell Proliferation Assay Kit from Chemicon International, Inc., Temecula, CA; Rapid Cell Viability Assay from Oncogene Research Products, San Diego, CA; Cell Proliferation Reagent WST-1 from R&D Systems, Minneapolis, MN);

WO 03/038113

PCT/US02/34730

measurement of live cells stained with "Cyto-dye" and dead cells stained with propidium iodide (Live/Dead Cell Staining Kit from BioVision, Inc., Mountain View, CA); and measurement of metabolic activity using bioluminescent detection of ATP (ApoSENSOR ATP Determination Kit from BioVision, Inc., Mountain View, CA; LumiTech's ViaLight HS Assay, LumiTech's ViaLight HT Assay, and LumiTech's ViaLight MDA Assay, all from BioWhittaker, Walkersville, MD; CytoLux Assay Kit from Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA; Cytotoxicity and Cell Proliferation Kit from Thermo Labsystems, Franklin, MA).

Additional examples of methods for measuring cellular proliferation include measurement of metabolic activity of viable cells via MTT reduction to formazan salt using a colorimetric assay (MTT Cell Growth Assay Kit from Chemicon International, Inc., Temecula, CA; Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit from Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI; TACS MTT Cell Proliferation and Viability Assay and Cell Proliferation Kit I MTT, both from R&D Systems, Minneapolis, MN; In Vitro Toxicology Assay Kit, MTT based from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); measurement of live cells stained with calcein-AM and dead cells labeled with propidium iodide (Cellstain Double-Staining Kit from Dojindo Molecular Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); measurement of DNA content using CyQUANT GR dye (CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit from Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); measurement of DNA synthesis by BrdU incorporation using ELISA-based chemiluminescent detection (BrdU Cell Proliferation Assay from Oncogene Research Products, San Diego, CA; Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent) from R&D Systems, Minneapolis, MN); and measurement of DNA synthesis by BrdU incorporation using ELISA-based colorimetric detection (BrdU Proliferation Assay - HTS from Oncogene Research Products, San Diego, CA; BrdU Labeling and Detection Kit III and Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), both from R&D Systems, Minneapolis, MN).

Further examples of methods for measuring cellular proliferation include measurement of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using biotinylated anti-PCNA monoclonal antibody (PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ELISA from Oncogene Research Products, San Diego, CA); measurement of DNA synthesis by BrdU incorporation detection using an anti-BrdU monoclonal antibody (BrdU IHC System from Oncogene Research Products, San Diego, CA; BrdU Kit from Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA); measurement of DNA synthesis by BrdU incorporation using

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Strand Break Induced Photolysis (SBIP) methodology, with break sites identified by BrdU incorporation (ABSOLUTE-S SBIP Cell Proliferation Assay Kit from Phoenix Flow Systems Inc., San Diego, CA); measurement of metabolic activity of viable cells via MTS reduction to soluble formazan salt using a colorimetric assay (CellTiter 96 Aqueous Non-
 5 Radioactive Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI); and measurement of metabolic activity of viable cells via MTS reduction to formazan salt using a colorimetric assay (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay from Promega, Madison, WI).

Additional examples of methods for measuring cellular proliferation include
 10 measurement of metabolic activity via bioluminescent of ATP using luciferin and thermostable luciferase (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay from Promega, Madison, WI); measurement of single-cell proliferation by direct immunofluorescence staining (In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS, and BrdU Labeling and Detection Kit I, both from R&D Systems, Minneapolis, MN) or indirect immunostaining method (BrdU
 15 Labeling and Detection Kit II from R&D Systems, Minneapolis, MN); measurement of metabolic activity of viable cells via XTT reduction to soluble formazan salt using a colorimetric assay (R&D Systems, Minneapolis, MN; In Vitro Toxicology Assay Kit, XTT based from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); detection of nuclear cell cycle-associated antigens expressed only in proliferating cells (Monoclonal Antibodies to Cell Cycle-
 20 Associated Antigens from R&D Systems, Minneapolis, MN); measurement of cell proliferation using plasma membrane dye (Cell Census Plus System from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); and measurement of membrane-associated phosphatase activity via conversion of p-nitrophenyl phosphate to a colored compound (In Vitro Toxicology Assay Kit, Acid Phosphatase based from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Still further examples of methods for measuring cellular proliferation include
 25 measurement of neutral red dye staining of viable cells using a colorimetric assay (In Vitro Toxicology Assay Kit, Neutral Red based from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); measurement of total protein upon sulforhodamine dye binding using a colorimetric assay (In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B based from Sigma-Aldrich, St. Louis,
 30 MO); measurement of metabolic activity of viable cells measured by tetrazolium reduction to formazan derivative using a colorimetric assay (In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactic Dehydrogenase based from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); measurement of metabolic activity of viable cells via the bioreduction of dye that converts the oxidized form (blue) to a fluorescent intermediate (red) (In Vitro Toxicology Assay Kit, Resazurin based from

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); measurement of DNA content using Quantos dye reagent (Quantos Cell Proliferation Assay Kit from Stratagene, La Jolla, CA); and measurement of DNA content by A:T base pair-binding dye (TACS Hoechst Cell Proliferation Assay I (CPA1) and TACS Hoechst Cell Proliferation Assay 2 (CPA2), both from Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD).

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay in which a 25943 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to or to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the 25943 protein or biologically active portion thereof is determined. Preferred biologically active portions of the 25943 proteins to be used in assays of the present invention include fragments which participate in interactions with non-25943 molecules, *e.g.*, fragments with high surface probability scores. Binding of the test compound to the 25943 protein can be determined either directly or indirectly as described above. Determining the ability of the 25943 protein to bind to a test compound can also be accomplished using a technology such as real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) *Anal. Chem.* 63:2338-2345; Szabo *et al.* (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705). As used herein, "BIA" is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (*e.g.*, BIAcore). Changes in the optical phenomenon of surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

In yet another embodiment, the cell-free assay involves contacting a 25943 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds the 25943 protein to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with the 25943 protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with the 25943 protein comprises determining the ability of the 25943 protein to preferentially bind to or modulate the activity of a 25943 target molecule (*e.g.*, a 25943 substrate).

The cell-free assays of the present invention are amenable to use of both soluble and/or membrane-bound forms of isolated proteins (*e.g.*, 25943 proteins or biologically active portions thereof). In the case of cell-free assays in which a membrane-bound form of an isolated protein is used it may be desirable to utilize a solubilizing agent such that the membrane-bound form of the isolated protein is maintained in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-

WO 03/038113

PCT/US02/34730

dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecypoly(ethylene glycol ether)_n, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamminio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamminio]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO), or
 5 N-dodecyl=N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate.

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it may be desirable to immobilize either 25943 or a 25943 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 25943
 10 protein, or interaction of a 25943 protein with a 25943 target molecule in the presence and absence of a test compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtitre plates, test tubes, and 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,
 15 glutathione-S-transferase/25943 fusion proteins or glutathione-S-transferase/target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtitre plates, which are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or 25943 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*,
 20 at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtitre plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix is immobilized in the case of beads, and complex formation is determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of 25943 binding or activity determined using standard techniques.

25 Other techniques for immobilizing proteins or cell membrane preparations on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either a 25943 protein or a 25943 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 25943 protein or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (*e.g.*,
 30 biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which are reactive with 25943 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 25943 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and

WO 03/038113

PCT/US02/34730

unbound target or 25943 protein is trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the 25943 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on
5 detecting an enzymatic activity associated with the 25943 protein or target molecule.

In yet another aspect of the invention, the 25943 protein or fragments thereof can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.*
10 (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300) to identify other proteins which bind to or interact with 25943 ("25943-binding proteins" or "25943-bp") and are involved in 25943 activity. Such 25943-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the 25943 proteins or 25943 targets as, for example, downstream elements of a 25943-mediated signaling pathway. Alternatively, such 25943-binding
15 proteins are likely to be 25943 inhibitors.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for a 25943 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known
20 transcription factor (*e.g.*, GAL-4). In the other construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a 25943-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close
25 proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene which encodes the protein which interacts with the 25943 protein.

In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the
30 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 25943 protein can be confirmed *in vivo*, *e.g.*, in an animal such as an animal model for tumorigenesis, as described elsewhere herein. Additionally, animals deficient in 25943

WO 03/038113

PCT/US02/34730

(e.g., 25943 knockout mice) may be deficient in the ability to modulate cellular proliferation via a 25943-regulated pathway, and therefore may be useful in determining whether a test compound can modulate proliferation by bypassing 25943 and directly modulating the activity of downstream components of the pathway.

- 5 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 in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (e.g., an 25943 modulating agent, an antisense 25943 nucleic acid molecule, an 25943-specific antibody, or an 25943-binding partner) can be
- 10 used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.
- 15 For example, the ability of the agent to modulate the activity of an 25943 protein can be tested in an animal such as an animal model for a cellular proliferation disorder, e.g., tumorigenesis. Animal based models for studying tumorigenesis *in vivo* are well known in the art (reviewed in Animal Models of Cancer Predisposition Syndromes, Hiai, H. and Hino, O. (eds.) 1999, *Progress in Experimental Tumor Research*, Vol. 35; Clarke, A.R. (2000) *Carcinogenesis* 21:435-41) and include, for example, carcinogen-induced
- 20 tumors (Rithidech, K. *et al.* (1999) *Mutat. Res.* 428:33-39; Miller, M.L. *et al.* (2000) *Environ. Mol. Mutagen.* 35:319-327), injection and/or transplantation of tumor cells into an animal, as well as animals bearing mutations in growth regulatory genes, for example, oncogenes (e.g., ras) (Arbeit, J.M. *et al.* (1993) *Am. J. Pathol.* 142:1187-1197; Sinn, E. *et al.* (1987) *Cell* 49:465-475; Thorgeirsson, SS *et al.* (2000) *Toxicol. Lett.* 112-113:553-555)
- 25 and tumor suppressor genes (e.g., p53) (Vooijs, M. *et al.* (1999) *Oncogene* 18:5293-5303; Clark A.R. (1995) *Cancer Metast. Rev.* 14:125-148; Kumar, T.R. *et al.* (1995) *J. Intern. Med.* 238:233-238; Donehower, L.A. *et al.* (1992) *Nature* 356:215-221). Furthermore, experimental model systems are available for the study of, for example, ovarian cancer
- 30 (Hamilton, T.C. *et al.* (1984) *Semin. Oncol.* 11:285-298; Rahman, N.A. *et al.* (1998) *Mol. Cell. Endocrinol.* 145:167-174; Beamer, W.G. *et al.* (1998) *Toxicol. Pathol.* 26:704-710), gastric cancer (Thompson, J. *et al.* (2000) *Int. J. Cancer* 86:863-869; Fodde, R. *et al.* (1999) *Cytogenet. Cell Genet.* 86:105-111), breast cancer (Li, M. *et al.* (2000) *Oncogene* 19:1010-1019; Green, J.E. *et al.* (2000) *Oncogene* 19:1020-1027), melanoma

WO 03/038113

PCT/US02/34730

- (Satyamoorthy, K. *et al.* (1999) *Cancer Metast. Rev.* 18:401-405); lung cancer (Malkinson, A.M. (2001) *Lung Cancer* 32(3):265-79; Zhao, B. *et al.* (2001) *Exp. Lung Res.* 26(8):567-79); colon cancer (Taketo, M.M. and Takaku (2000) *Hum. Cell* 13(3):85-95; Fodde, R. and Smits, R. (2001) *Trends. Mol. Med.* 7(8):369-73); and prostate cancer (Shirai, T. *et al.* (2000) *Mutat. Res.* 462:219-226; Bostwick, D.G. *et al.* (2000) *Prostate* 43:286-294).
- 5 Other animal models which may be useful in the methods of the invention include mice with null mutations in the glycosylasparaginase gene (Kartinen, V. *et al.* (1996) *Nat. Med.* 2:1375-1378).
- Additional examples of mouse models for cancer are detailed below. For example,
- 10 the *Apc^{min}* mouse is the most thoroughly characterized genetic model of human colorectal carcinogenesis. This model provides a valuable tool for identifying changes in gene expression associated with early stage disease resulting from the loss of Apc gatekeeper function. Adenomatous polyps and normal colonic epithelium from these mice may be harvested for standard and subtracted cDNA library construction and probe generation for
- 15 microarray analysis. The *Apc^{1638N}* mouse was generated by introducing a PGK-neomycin gene at codon 1638 of the Apc gene. After 6-8 weeks, these mice form aberrant crypt foci which ultimately progress to carcinomas by 4 months of age. These mice on average develop 5-6 tumors within the upper gastrointestinal tract. In addition, these mice also develop extraintestinal tumors and desmoids. This lineage provides a means of studying
- 20 extracolonic manifestations seen in familial adenomatous polyposis (FAP) patients such as desmoid disease. The *Smad3^{-/-}* mouse has recently been described as a useful and unique model for human colorectal carcinogenesis. *Smad3^{-/-}* mice develop colon carcinomas that histopathologically resemble human disease. One advantage of this model is that samples from several stages of disease progression can be isolated, including normal epithelium,
- 25 hyperplastic epithelium, adenomatous polyps, and various degrees of primary carcinoma and lymph node metastases. Thus, the generation of subtracted cDNA libraries and probes representing these stages are a powerful tool for identifying and validating colon cancer targets.
- Also useful in the methods of the invention are mis-match repair models (MMRs).
- 30 Hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC), which is caused by germline mutations in MSH2 & MLH1, genes involved in DNA mismatch repair, accounts for 5-15% of colon cancer cases. Mouse models have been generated carrying null mutations in the MLH1, MSH2 and MSH3 genes.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Xenograft mouse models are made by grafting cells from colon tumor cell lines into mice, *e.g.*, nude mice. Such genes could be crucial targets for anti-cancer drug development. Examples of colon tumor cell lines which may be used in the methods of the invention to create xenograft mouse models include HCT116, HT29, SW480, SW620,
 5 Colon 26, DLD1, Caco2, colo205, T84, CC-ML3, KM12C, KM12SM, HCC-2998, HCT-15, KM20L2, and KM12.

Examples of ovary tumor cell lines which may be used in the methods of the invention include cell lines SKOV3, SKOV3/Variant, OVCAR-3, OVCAR-4, and HEY. The SKOV3/Var cell line is a variant of the parental cell line SKOV3 that is resistant to
 10 cisplatin.

The HCT-116 human colon carcinoma cell line can be grown as a subcutaneous or orthotopic xenograft (intracaeal injection) in athymic nude mice, but metastasizes with low frequency. Rare liver and lung metastases can be isolated, expanded *in vitro*, and reimplanted *in vivo*. A limited (1-3) number of iterations of this process can be employed
 15 to isolate highly metastatic variants of the parental cell line. Standard and subtracted cDNA libraries and probes can be generated from the parental and variant cell lines to identify genes associated with the acquisition of a metastatic phenotype. This model can be established using several alternative human colon carcinoma cell lines, including SW480 and KM12C.

20 Additional animal models which may be useful in the methods of the invention are described in the Examples section herein.

In another aspect, cell-based systems, as described herein, may be used to identify compounds which may act to ameliorate tumorigenic or apoptotic disease symptoms. For example, such cell systems may be exposed to a compound, suspected of exhibiting an
 25 ability to ameliorate tumorigenic or apoptotic disease symptoms, at a sufficient concentration and for a time sufficient to elicit such an amelioration of tumorigenic or apoptotic disease symptoms in the exposed cells. After exposure, the cells are examined to determine whether one or more of the tumorigenic or apoptotic disease cellular phenotypes has been altered to resemble a more normal or more wild type, non-tumorigenic disease or
 30 non-apoptotic disease phenotype. Cellular phenotypes that are associated with tumorigenic disease states include aberrant proliferation and migration, angiogenesis, anchorage independent growth, and loss of contact inhibition. Cellular phenotypes that are associated with apoptotic disease states include aberrant DNA fragmentation, membrane blebbing, caspase activity, and cytochrome c release from mitochondria.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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

With regard to intervention, any treatments which reverse any aspect of tumorigenic or apoptotic disease symptoms should be considered as candidates for human tumorigenic or apoptotic disease therapeutic intervention. Dosages of test agents may be determined by deriving dose-response curves.

Additionally, gene expression patterns may be utilized to assess the ability of a compound to ameliorate cardiovascular or tumorigenic disease symptoms. For example, the expression pattern of one or more genes may form part of a "gene expression profile" or "transcriptional profile" which may be then be used in such an assessment. "Gene expression profile" or "transcriptional profile", as used herein, includes the pattern of mRNA expression obtained for a given tissue or cell type under a given set of conditions. Such conditions may include, but are not limited to, the presence of a tumor, *e.g.*, a breast, colon, ovary, or lung tumor, including any of the control or experimental conditions described herein, for example, synchronized cells induced to enter the cell cycle, or RER- or Smad4 models. Other conditions may include, for example, cell differentiation, transformation, metastasis, and carcinogen exposure. Gene expression profiles may be generated, for example, by utilizing a differential display procedure, Northern analysis and/or RT-PCR. In one embodiment, 25943 gene sequences may be used as probes and/or PCR primers for the generation and corroboration of such gene expression profiles.

Gene expression profiles may be characterized for known states, either tumorigenic or apoptotic disease or normal, within the cell- and/or animal-based model systems.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Subsequently, these known gene expression profiles may be compared to ascertain the effect a test compound has to modify such gene expression profiles, and to cause the profile to more closely resemble that of a more desirable profile.

For example, administration of a compound may cause the gene expression profile of a tumorigenic or apoptotic disease model system to more closely resemble the control system. Administration of a compound may, alternatively, cause the gene expression profile of a control system to begin to mimic a tumorigenic or apoptotic disease state. Such a compound may, for example, be used in further characterizing the compound of interest, or may be used in the generation of additional animal models.

10

II. Predictive Medicine:

The present invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically. Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining 25943 protein and/or nucleic acid expression as well as 25943 activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, ascites, cells, or tissue, *e.g.*, breast, lung, colon, or ovarian tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a cellular proliferation disorder. The invention also provides for prognostic (or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a cellular proliferation disorder. For example, mutations in a 25943 gene can be assayed for in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a cellular proliferation disorder.

Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of 25943 modulators (*e.g.*, anti-25943 antibodies or 25943 ribozymes) on the expression or activity of 25943 in clinical trials.

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

A. Diagnostic Assays For Cellular Proliferation Disorders

To determine whether a subject is afflicted with a cellular proliferation disorder, a biological sample may be obtained from a subject and the biological sample may be contacted with a compound or an agent capable of detecting a 25943 protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA or genomic DNA) that encodes a 25943 protein, in the biological sample. A preferred agent for detecting 25943 mRNA or genomic DNA is a labeled

WO 03/038113

PCT/US02/34730

nucleic acid probe capable of hybridizing to 25943 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, the 25943 nucleic acid set forth in SEQ ID NO:1, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 20, 25, 30, 25, 40, 45, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to 25943 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the

5 diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting 25943 protein in a sample is an antibody capable of binding to 25943 protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof

10 (e.g., Fab or F(ab')₂) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of direct substances that can be coupled to an antibody or a nucleic acid probe

15 include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin.

The term "biological sample" is intended to include tissues, cells, and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells, and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect 25943 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of 25943 mRNA include Northern hybridizations and *in situ*

25 hybridizations. *In vitro* techniques for detection of 25943 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of 25943 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of 25943 protein include introducing into a subject a labeled anti-25943 antibody. For example, the

30 antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting 25943 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of

WO 03/038113

PCT/US02/34730

25943 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of 25943 protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of 25943 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

5 **B. Prognostic Assays For Cellular Proliferation Disorder**

The present invention further pertains to methods for identifying subjects having or at risk of developing a cellular proliferation disorder with aberrant 25943 expression or activity.

As used herein, the term "aberrant" includes a 25943 expression or activity which
 10 deviates from the wild type 25943 expression or activity. Aberrant expression or activity includes increased or decreased expression or activity, as well as expression or activity which does not follow the wild type developmental pattern of expression or the subcellular pattern of expression. For example, aberrant 25943 expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the 25943 gene causes the 25943 gene to be
 15 under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional 25943 protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, *e.g.*, a protein which does not interact with a 25943 substrate, or one which interacts with a non-25943 substrate.

The assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the
 20 following assays, can be used to identify a subject having or at risk of developing a cellular proliferation disorder, *e.g.*, breast cancer, colon cancer, lung, cancer, and/or ovarian cancer. A biological sample may be obtained from a subject and tested for the presence or absence of a genetic alteration. For example, such genetic alterations can be detected by ascertaining the existence of at least one of 1) a deletion of one or more nucleotides from a
 25 25943 gene, 2) an addition of one or more nucleotides to a 25943 gene, 3) a substitution of one or more nucleotides of a 25943 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 25943 gene, 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 25943 gene, 6) aberrant modification of a 25943 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
 30 a 25943 gene, 8) a non-wild type level of a 25943-protein, 9) allelic loss of a 25943 gene, and 10) inappropriate post-translational modification of a 25943-protein.

As described herein, there are a large number of assays known in the art which can be used for detecting genetic alterations in a 25943 gene. For example, a genetic alteration in a 25943 gene may be detected using a probe/primer in a polymerase chain reaction

WO 03/038113

PCT/US02/34730

(PCR) (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, *e.g.*, Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in a 25943 gene (see Abravaya *et al.* (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:675-682). This method includes collecting a biological sample from a subject, isolating nucleic acid (*e.g.*, genomic DNA, mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a 25943 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 25943 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.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli, J.C. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, D.Y. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi, P.M. *et al.* (1988) *Bio-Technology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a 25943 gene from a biological sample can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Patent No. 5,498,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

In other embodiments, genetic mutations in 25943 can be identified by hybridizing biological sample derived and control nucleic acids, *e.g.*, DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotide probes (Cronin, M.T. *et al.* (1996) *Hum. Mutat.* 7:244-255; Kozal, M.J. *et al.* (1996) *Nat. Med.* 2:753-759). For example, genetic mutations in 25943 can be identified in two dimensional arrays

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the 25943 gene in a biological sample and detect mutations by comparing the sequence of the 25943 in the biological sample with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxam and Gilbert (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560) or Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeye, C.W. (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry (see, *e.g.*, PCT International Publication No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv. Chromatogr.* 36:127-162; and Griffin *et al.* (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the 25943 gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type 25943 sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent which cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digest the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for

WO 03/038113

PCT/US02/34730

example, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397 and Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

- 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 25943 cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at G/T mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662).
- According to an exemplary embodiment, a probe based on a 25943 sequence, *e.g.*, a wild-type 25943 sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Patent No. 5,459,039.
- In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in 25943 genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP) may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl. Acad. Sci USA* 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 25943 nucleic acids will be denatured and allowed to renature. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA (rather than DNA), in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In a preferred embodiment, the subject method utilizes heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet.* 7:5).
- In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). When DGGE is used as the method of analysis, DNA will be modified to ensure that it does not 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

WO 03/038113

PCT/US02/34730

place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:12753).

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

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

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered a 25943 modulator (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule) to effectively treat a cellular proliferation disorder.

30

C. Monitoring of Effects During Clinical Trials

The present invention further provides methods for determining the effectiveness of a 25943 modulator (*e.g.*, a 25943 modulator identified herein) in treating a cellular proliferation disorder in a subject. For example, the effectiveness of a 25943 modulator in

WO 03/038113

PCT/US02/34730

increasing 25943 gene expression, protein levels, or in upregulating 25943 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased 25943 gene expression, protein levels, or downregulated 25943 activity. Alternatively, the effectiveness of a 25943 modulator in decreasing 25943 gene expression, protein levels, or in downregulating 25943 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 25943 gene expression, protein levels, or 25943 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 25943 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a cellular proliferation disorder can be used as a "read out" or marker of the phenotype of a particular cell.

For example, and not by way of limitation, genes, including 25943, that are modulated in cells by treatment with an agent which modulates 25943 activity (*e.g.*, identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents which modulate 25943 activity on subjects suffering from a cellular proliferation disorder in, for example, a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of 25943 and other genes implicated in the cellular proliferation disorder. The levels of gene expression (*e.g.*, a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods described herein, or by measuring the levels of activity of 25943 or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent which modulates 25943 activity. This response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent which modulates 25943 activity.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent which modulates 25943 activity (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule identified by the screening assays described herein) including the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a 25943 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the 25943 protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the 25943 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the 25943 protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or

WO 03/038113

PCT/US02/34730

samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of 25943 to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease
 5 expression or activity of 25943 to lower levels than detected, *i.e.*, to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, 25943 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an observable phenotypic response.

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

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject, *e.g.*, a human, at risk of (or susceptible to) a cellular proliferation disorder such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and/or colon cancer. As used herein, "treatment" of a subject includes the application or administration of a therapeutic
 15 agent to a subject, or application or administration of a therapeutic agent to a cell or tissue from a subject, who has a diseases or disorder, has a symptom of a disease or disorder, or is at risk of (or susceptible to) a disease or disorder, with the purpose of curing, healing, alleviating, relieving, altering, remedying, ameliorating, improving, or affecting the disease or disorder, the symptom of the disease or disorder, or the risk of (or susceptibility
 20 to) the disease or disorder. As used herein, a "therapeutic agent" includes, but is not limited to, small molecules, peptides, polypeptides, antibodies, ribozymes, and antisense oligonucleotides.

With regard to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the
 25 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 to the study of how a patient's genes determine his or her response to a drug (*e.g.*, a patient's "drug response phenotype", or "drug response
 30 genotype").

Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring a subject's prophylactic or therapeutic treatment with either the 25943 molecules of the present invention or 25943 modulators according to that individual's drug response genotype. Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic

WO 03/038113

PCT/US02/34730

treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

A. Prophylactic Methods

5 In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a cellular proliferation disorder by administering to the subject an agent which modulates 25943 expression or 25943 activity, *e.g.*, modulation of cellular proliferation in, *e.g.*, breast, lung, colon, or ovary cells. Subjects at risk for a cellular proliferation disorder can be identified by, for example, any or a combination of the diagnostic or prognostic assays
10 described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of aberrant 25943 expression or activity, such that a cellular proliferation disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 25943 aberrancy, for example, a 25943 molecule, 25943 agonist or 25943 antagonist agent can be used for treating the subject. The
15 appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

B. Therapeutic Methods

Another aspect of the invention pertains to methods for treating a subject suffering from a cellular proliferation disorder. These methods involve administering to a subject an
20 agent which modulates 25943 expression or activity (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described herein), or a combination of such agents. In another embodiment, the method involves administering to a subject a 25943 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 25943 expression or activity.

25 Stimulation of 25943 activity is desirable in situations in which 25943 is abnormally downregulated and/or in which increased 25943 activity is likely to have a beneficial effect, *i.e.*, an increase in cellular proliferation, thereby ameliorating a cellular proliferation disorder such as a neurodegenerative disorder in a subject. Likewise, inhibition of 25943 activity is desirable in situations in which 25943 is abnormally
30 upregulated and/or in which decreased 25943 activity is likely to have a beneficial effect, *e.g.*, an decrease in cellular proliferation, thereby ameliorating a cellular proliferation disorder such as breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, or colon cancer in a subject.

The agents which modulate 25943 activity can be administered to a subject using pharmaceutical compositions suitable for such administration. Such compositions

WO 03/038113

PCT/US02/34730

- typically comprise the agent (*e.g.*, nucleic acid molecule, protein, or antibody) and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.
- 10 A pharmaceutical composition used in the therapeutic methods of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include
- 15 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
- 20 such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.
- Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous
- 25 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 syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the
- 30 contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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, and sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the agent that modulates 25943 activity (*e.g.*, a fragment of a 25943 protein or an anti-25943 antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions 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.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth 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.

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 03/038113

PCT/US02/34730

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.

The agents that modulate 25943 activity can also be prepared in the form of suppositories (*e.g.*, with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the agents that modulate 25943 activity 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.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the agent that modulates 25943 activity and the particular therapeutic effect to be achieved, and the limitations inherent in the art of compounding such an agent for the treatment of subjects.

Toxicity and therapeutic efficacy of such agents can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, *e.g.*, for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is

WO 03/038113

PCT/US02/34730

the therapeutic index and can be expressed as the ratio LD₅₀/ED₅₀. Agents which exhibit large therapeutic indices are preferred. While agents that exhibit toxic side effects may be used, care should be taken to design a delivery system that targets such agents to the site of affected tissue in order to minimize potential damage to uninfected cells and, thereby,
5 reduce side effects.

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 25943 modulating agents lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the
10 dosage form employed and the route of administration utilized. For any agent used in the therapeutic methods of the invention, the therapeutically effective dose can be estimated initially from cell culture assays. A dose may be formulated in animal models to achieve a circulating plasma concentration range that includes the IC₅₀ (*i.e.*, the concentration of the test compound which achieves a half-maximal inhibition of symptoms) as determined in
15 cell culture. Such information can be used to more accurately determine useful doses in humans. Levels in plasma may be measured, for example, by high performance liquid chromatography.

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
20 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 skilled artisan will appreciate that certain factors may influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the
25 subject, and other diseases present. Moreover, treatment of a subject with a therapeutically effective amount of a protein, polypeptide, or antibody can include a single treatment or, preferably, can include a series of treatments.

In a preferred example, a subject is treated with antibody, protein, or polypeptide in the range of between about 0.1 to 20 mg/kg body weight, one time per week for between
30 about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. It will also be appreciated that the effective dosage of antibody, protein, or polypeptide used for treatment may increase or decrease over the course of a particular treatment. Changes in dosage may result and become apparent from the results of diagnostic assays as described herein.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

The present invention encompasses agents which modulate expression or activity. An agent may, for example, be a small molecule. For example, such small molecules include, but are not limited to, peptides, peptidomimetics, amino acids, amino acid analogs, polynucleotides, polynucleotide analogs, nucleotides, nucleotide analogs, organic or inorganic compounds (*i.e.*, including heteroorganic and organometallic compounds) 5 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 10 mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds. It is understood that appropriate doses of small molecule agents depends upon a number of factors within the ken of the ordinarily skilled physician, veterinarian, or researcher. The dose(s) of the small molecule will vary, for example, depending upon the identity, size, and condition of the subject or sample being treated, further depending upon the route by 15 which the composition is to be administered, if applicable, and the effect which the practitioner desires the small molecule to have upon the nucleic acid or polypeptide of the invention.

Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per kilogram of subject or sample weight (*e.g.*, about 1 microgram per kilogram to about 20 500 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. Such appropriate doses may be determined using the assays described herein. When one 25 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 may, for example, prescribe a relatively low dose at first, subsequently increasing the dose until an appropriate response is obtained. In addition, it is understood that the specific dose level for any particular animal subject will 30 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.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Further, an antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, 5 tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents include, but are not limited to, antimetabolites (e.g., methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), 10 alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, 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 15 (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).

The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, 20 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 25 stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Armon *et al.*, "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies for Drug Delivery", in 30 *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies*

WO 03/038113

PCT/US02/34730

for *Cancer Detection and Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.* (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58. Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by

5 Segal in U.S. Patent No. 4,676,980.

The nucleic acid molecules used in the methods of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (see U.S. Patent No. 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

15 delivery system.

C. Pharmacogenomics

In conjunction with the therapeutic methods of the invention, pharmacogenomics (*i.e.*, the study of the relationship between a subject's genotype and that subject's response

20 to a foreign compound or drug) may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer an agent which

25 modulates 25943 activity, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with an agent which modulates 25943 activity.

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, M. *et al.* (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23(10-11):983-985 and Linder, M.W. *et al.* (1997) *Clin. Chem.* 43(2):254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic

WO 03/038113

PCT/US02/34730

defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate aminopeptidase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

5 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
10 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
15 alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner,
20 treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.

Alternatively, a method termed the "candidate gene approach" can be utilized to identify genes that predict drug response. According to this method, if a gene that encodes a drug target is known (*e.g.*, a 25943 protein of the present invention), all common variants
25 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.

As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (*e.g.*, N-acetyltransferase 2 (NAT 2)
30 and the cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among

WO 03/038113

PCT/US02/34730

different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses.

5 If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

10 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 25943 molecule or 25943 modulator of the present invention) can give an indication whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information generated from more than one of the above pharmacogenomics
15 approaches can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment of a subject. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and, thus, enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject suffering from a cellular proliferation disorder with an agent which modulates 25943 activity.

20

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

The methods of the invention (*e.g.*, the screening assays described herein) include the use of vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding a
25 25943 protein (or a portion thereof). As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain
30 vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of

WO 03/038113

PCT/US02/34730

genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, which is operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner which allows for expression of the nucleotide sequence (*e.g.*, in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Regulatory sequences include those which direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cells and those which direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (*e.g.*, tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, and the like. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (*e.g.*, 25943 proteins, mutant forms of 25943 proteins, fusion proteins, and the like).

The recombinant expression vectors to be used in the methods of the invention can be designed for expression of 25943 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, 25943 proteins can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors), yeast cells, or mammalian cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel (1990) *supra*. Alternatively, the recombinant expression

WO 03/038113

PCT/US02/34730

vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

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

Purified fusion proteins can be utilized in 25943 activity assays, (*e.g.*, direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 25943 proteins. In a preferred embodiment, a 25943 fusion protein expressed in a retroviral expression vector of the present invention can be utilized to infect bone marrow cells which are subsequently transplanted into irradiated recipients. The pathology of the subject recipient is then examined after sufficient time has passed (*e.g.*, six weeks).

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

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. 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 α -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

The methods of the invention may further use a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner which allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule which is antisense to 25943 mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen which direct constitutive, tissue specific, or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid, or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes, see Weintraub, H. *et al.*, Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, *Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to the use of host cells into which a 25943 nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, a 25943 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 25943 nucleic acid molecule containing

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, a 25943 protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

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

A host cell used in the methods of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) a 25943 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a 25943 protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of the invention (into which a recombinant expression vector encoding a 25943 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 25943 protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating a 25943 protein from the medium or the host cell.

30 V. Isolated Nucleic Acid Molecules Used in the Methods of the Invention

The cDNA sequence of the isolated human 25943 gene and the predicted amino acid sequence of the human 25943 polypeptide are shown in SEQ ID NOs:1 and 2, respectively. Nucleotides 123-1046 of SEQ ID NO:1, set forth as SEQ ID NO:3, comprise the 25943 coding region.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

The methods of the invention include the use of isolated nucleic acid molecules that encode 25943 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify 25943-encoding nucleic acid molecules (*e.g.*, 25943 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the amplification or mutation of 25943 nucleic acid molecules. As used herein, the term “nucleic acid molecule” is intended to include DNA molecules (*e.g.*, cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (*e.g.*, mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

A nucleic acid molecule used in the methods of the present invention, *e.g.*, a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 as a hybridization probe, 25943 nucleic acid molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (*e.g.*, as described in Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

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

A nucleic acid used in the methods of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or, alternatively, genomic DNA as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. Furthermore, oligonucleotides corresponding to 25943 nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, *e.g.*, using an automated DNA synthesizer.

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

In still another preferred embodiment, an isolated nucleic acid molecule used in the methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is at least about

WO 03/038113

PCT/US02/34730

55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% or more identical to the entire length of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, or a portion of any of this nucleotide sequence.

Moreover, the nucleic acid molecules used in the methods of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, for example, a fragment which can be used as a probe or primer or a fragment encoding a portion of a 25943 protein, *e.g.*, a biologically active portion of a 25943 protein. The probe/primer typically comprises substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12 or 15, preferably about 20 or 25, more preferably about 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 75 consecutive nucleotides of a sense sequence of SEQ ID NO:1 or an anti-sense sequence of SEQ ID NO:1, or of a naturally occurring allelic variant or mutant of SEQ ID NO:1. In one embodiment, a nucleic acid molecule used in the methods of the present invention comprises a nucleotide sequence which is greater than 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1.

As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences that are significantly identical or homologous to each other remain hybridized to each other. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 70%, more preferably at least about 80%, even more preferably at least about 85% or 90% identical to each other remain hybridized to each other. Such stringent conditions are known to those skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), sections 2, 4 and 6. Additional stringent conditions can be found in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), chapters 7, 9 and 11. A preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions includes hybridization in 4X or 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC), at about 65-70°C (or hybridization in 4X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 1X SSC, at about 65-70°C. A further preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions includes hybridization at 6X SSC at 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC,

WO 03/038113

PCT/US02/34730

0.1% SDS at 65°C. A preferred, non-limiting example of highly stringent hybridization conditions includes hybridization in 1X SSC, at about 65-70°C (or hybridization in 1X SSC plus 50% formamide at about 42-50°C) followed by one or more washes in 0.3X SSC, at about 65-70°C. A preferred, non-limiting example of reduced stringency

5 hybridization conditions includes hybridization in 4X or 6X SSC, at about 50-60°C (or alternatively hybridization in 6X SSC plus 50% formamide at about 40-45°C) followed by one or more washes in 2X SSC, at about 50-60°C. Ranges intermediate to the above-recited values, *e.g.*, at 65-70°C or at 42-50°C are also intended to be encompassed by the present invention. SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, and 1.25mM EDTA,

10 pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes each after hybridization is complete. The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less

15 than 18 base pairs in length, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\# \text{ of A + T bases}) + 4(\# \text{ of G + C bases})$. For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - (600/\text{N})$, where N is the number of bases in the hybrid, and $[\text{Na}^+]$ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer ($[\text{Na}^+]$ for 1xSSC = 0.165 M). It will also be recognized by the skilled practitioner that additional reagents may be added to

20 hybridization and/or wash buffers to decrease non-specific hybridization of nucleic acid molecules to membranes, for example, nitrocellulose or nylon membranes, including but not limited to blocking agents (*e.g.*, BSA or salmon or herring sperm carrier DNA), detergents (*e.g.*, SDS), chelating agents (*e.g.*, EDTA), Ficoll, PVP and the like. When using nylon membranes, in particular, an additional preferred, non-limiting example of

25 stringent hybridization conditions is hybridization in 0.25-0.5M NaH₂PO₄, 7% SDS at about 65°C, followed by one or more washes at 0.02M NaH₂PO₄, 1% SDS at 65°C, see *e.g.*, Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, (or alternatively 0.2X SSC, 1% SDS).

In preferred embodiments, the probe further comprises a label group attached

30 thereto, *e.g.*, the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress a 25943 protein, such as by measuring a level

WO 03/038113

PCT/US02/34730

of a 25943-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject *e.g.*, detecting 25943 mRNA levels or determining whether a genomic 25943 gene has been mutated or deleted.

The methods of the invention further encompass the use of nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 due to degeneracy of the genetic code and thus encode the same 25943 proteins as those encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule included in the methods of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2.

The methods of the invention further include the use of allelic variants of human 25943, *e.g.*, functional and non-functional allelic variants. Functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 25943 protein that maintain a 25943 activity. Functional allelic variants will typically contain only conservative substitution of one or more amino acids of SEQ ID NO:2, or substitution, deletion or insertion of non-critical residues in non-critical regions of the protein.

Non-functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 25943 protein that do not have a 25943 activity. Non-functional allelic variants will typically contain a non-conservative substitution, 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.

The methods of the present invention may further use non-human orthologues of the human 25943 protein. Orthologues of the human 25943 protein are proteins that are isolated from non-human organisms and possess the same 25943 activity.

The methods of the present invention further include the use of nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, in which a mutation has been introduced. The mutation may lead to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues or at "essential" amino acid residues. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of 25943 (*e.g.*, the sequence of SEQ ID NO:2) without altering the biological activity, whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the 25943 proteins of the present invention and other members of the glycosylasparaginase family are not likely to be amenable to alteration.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino

WO 03/038113

PCT/US02/34730

acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A “conservative amino acid substitution” is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 25943 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 25943 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for 25943 biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NO:1, the encoded protein can be expressed recombinantly and the activity of the protein can be determined using an assay described herein.

Another aspect of the invention pertains to the use of isolated nucleic acid molecules which are antisense to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1. An “antisense” nucleic acid comprises a nucleotide sequence which is complementary to a “sense” nucleic acid encoding a protein, *e.g.*, complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. Accordingly, an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 25943 coding strand, or to only a portion thereof. In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a “coding region” of the coding strand of a nucleotide sequence encoding a 25943. The term “coding region” refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues. In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is antisense to a “noncoding region” of the coding strand of a nucleotide sequence encoding 25943. The term “noncoding region” refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding 25943 disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick

WO 03/038113

PCT/US02/34730

base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of 25943 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 25943 mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 25943 mRNA. An antisense oligonucleotide can be, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis and enzymatic 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. Examples of modified nucleotides which can be used to generate the antisense nucleic acid include 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (*v*), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (*v*), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)*w*, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (*i.e.*, RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

The antisense nucleic acid molecules used in the methods of the invention are typically administered to a subject or generated *in situ* such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a 25943 protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex,

WO 03/038113

PCT/US02/34730

or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention include direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, *e.g.*, by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies which bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of the antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a strong pol II or pol III promoter are preferred.

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

In still another embodiment, an antisense nucleic acid used in the methods of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity which are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (*e.g.*, hammerhead ribozymes (described in Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) can be used to catalytically cleave 25943 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of 25943 mRNA. A ribozyme having specificity for a 25943-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a 25943 cDNA disclosed herein (*i.e.*, SEQ ID NO:1). For example, a derivative of a *Tetrahymena* L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a 25943-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, 25943 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Alternatively, 25943 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 25943 (*e.g.*, the 25943 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 25943 gene in target cells. See generally, Helene, C. (1991) *Anticancer Drug Des.* 6(6):569-84; Helene, C. *et al.* (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:27-36; and Maher, L.J. (1992) *Bioessays* 14(12):807-15.

In yet another embodiment, the 25943 nucleic acid molecules used in the methods of the present invention can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, *e.g.*, the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acid molecules can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup, B. and Nielsen, P.E. (1996) *Bioorg. Med. Chem.* 4(1):5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, *e.g.*, DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup B. and Nielsen (1996) *supra* and Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14670-675.

PNAs of 25943 nucleic acid molecules can be used in the therapeutic and diagnostic applications described herein. 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 25943 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 and Nielsen (1996) *supra*)); or as probes or primers for DNA sequencing or hybridization (Hyrup and Nielsen (1996) *supra*; Perry-O'Keefe *et al.* (1996) *supra*).

In another embodiment, PNAs of 25943 can be modified, (*e.g.*, to enhance their stability or cellular uptake), by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of 25943 nucleic acid molecules can be generated which may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA recognition enzymes, (*e.g.*, RNase H and DNA

WO 03/038113

PCT/US02/34730

polymerases), to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup and Nielsen (1996) *supra*). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup and Nielsen (1996) *supra* and Finn P.J. *et al.* (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17):3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry and modified nucleoside analogs, *e.g.*, 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA (Mag, M. *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment and a 3' DNA segment (Finn *et al.* (1996) *supra*). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment (Peterser, K.H. *et al.* (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5:1119-11124).

15 In other embodiments, the oligonucleotide used in the methods of the invention may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *e.g.*, Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT Publication No. WO 88/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. WO 89/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization-triggered cleavage agents (see, *e.g.*, Krol *et al.* (1988) *Biotechniques* 6:958-976) or intercalating agents (see, *e.g.*, Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, (*e.g.*, a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

25

VI. Isolated 25943 Proteins and Anti-25943 Antibodies Used in the Methods of the Invention

The methods of the invention include the use of isolated 25943 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-25943 antibodies. In one embodiment, native 25943 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 25943 proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a

WO 03/038113

PCT/US02/34730

25943 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

As used herein, a "biologically active portion" of a 25943 protein includes a fragment of a 25943 protein having a 25943 activity. Biologically active portions of a 25943 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to or derived from the amino acid sequence of the 25943 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include fewer amino acids than the full length 25943 proteins, and exhibit at least one activity of a 25943 protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 25943 protein.

A biologically active portion of a 25943 protein can be a polypeptide which is, for example, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 or more amino acids in length. Biologically active portions of a 25943 protein can be used as targets for developing agents which modulate a 25943 activity.

In a preferred embodiment, the 25943 protein used in the methods of the invention has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. In other embodiments, the 25943 protein is substantially identical to SEQ ID NO:2, and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail in subsection V above. Accordingly, in another embodiment, the 25943 protein used in the methods of the invention is a protein which comprises an amino acid sequence at least about 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% or more identical to SEQ ID NO:2.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-identical sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, or 90% of the length of the reference sequence (*e.g.*, when aligning a second sequence to the 25943 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 308 amino acid residues, at least 92, preferably at least 123, more preferably at least 154, even more preferably at least 185, and even more preferably at least 216, 246, 277 or more amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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.

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

The methods of the invention may also use 25943 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 25943 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a 25943 polypeptide operatively linked to a non-25943 polypeptide. A "25943 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a 25943 molecule, whereas a "non-25943 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 25943 protein, *e.g.*, a protein which is different from the 25943 protein and which is derived from the same or a different organism. Within a 25943 fusion protein the 25943 polypeptide can correspond to all or a portion of a 25943 protein. In a preferred embodiment, a 25943 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a 25943 protein. In another preferred embodiment, a 25943 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a 25943 protein. Within the fusion protein, the term "operatively

WO 03/038113

PCT/US02/34730

linked" is intended to indicate that the 25943 polypeptide and the non-25943 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-25943 polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the 25943 polypeptide.

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-25943 fusion protein in which the 25943 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 25943.

In another embodiment, this fusion protein is a 25943 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells), expression and/or secretion of 25943 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

The 25943 fusion proteins used in the methods of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 25943 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 25943 substrate. Use of 25943 fusion proteins may be useful therapeutically for the treatment of disorders caused by, for example, (i) aberrant modification or mutation of a gene encoding a 25943 protein; (ii) mis-regulation of the 25943 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 25943 protein.

Moreover, the 25943-fusion proteins used in the methods of the invention can be used as immunogens to produce anti-25943 antibodies in a subject, to purify 25943 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 25943 with a 25943 substrate.

Preferably, a 25943 chimeric or fusion protein used in the methods of the invention is produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, for example by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers.

Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers which give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments which can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.* John Wiley & Sons:1992). Moreover, many expression vectors are commercially

WO 03/038113

PCT/US02/34730

available that already encode a fusion moiety (*e.g.*, a GST polypeptide). A 25943-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 25943 protein.

The present invention also pertains to the use of variants of the 25943 proteins which function as either 25943 agonists (mimetics) or as 25943 antagonists. Variants of the 25943 proteins can be generated by mutagenesis, *e.g.*, discrete point mutation or truncation of a 25943 protein. An agonist of the 25943 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 25943 protein. An antagonist of a 25943 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 25943 protein by, for example, competitively modulating a 25943-mediated activity of a 25943 protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the

naturally occurring form of the 25943 protein.

In one embodiment, variants of a 25943 protein which function as either 25943 agonists (mimetics) or as 25943 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, *e.g.*, truncation mutants, of a 25943 protein for 25943 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of 25943 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of 25943 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential 25943 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (*e.g.*, for phage display) containing the set of 25943 sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential 25943 variants from a degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential 25943 sequences. Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (*see, e.g.*, Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acids Res.* 11:477).

WO 03/038113

PCT/US02/34730

In addition, libraries of fragments of a 25943 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of 25943 fragments for screening and subsequent selection of variants of a 25943 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a 25943 coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA which can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which encodes N-terminal, C-terminal and internal fragments of various sizes of the 25943 protein.

Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of 25943 proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high through-put analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique which enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify 25943 variants (Arkin and Youvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delagrave *et al.* (1993) *Protein Eng.* 6(3):327-331).

The methods of the present invention further include the use of anti-25943 antibodies. An isolated 25943 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind 25943 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A full-length 25943 protein can be used or, alternatively, antigenic peptide fragments of 25943 can be used as immunogens. The antigenic peptide of 25943 comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of 25943 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the 25943 protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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

Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 25943 that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

A 25943 immunogen is typically used to prepare antibodies by immunizing a suitable subject, (*e.g.*, rabbit, goat, mouse, or other mammal) with the immunogen. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, recombinantly expressed 25943 protein or a chemically synthesized 25943 polypeptide. The preparation can further include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic 25943 preparation induces a polyclonal anti-25943 antibody response.

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as a 25943. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab')₂ fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin. The invention provides polyclonal and monoclonal antibodies that bind 25943 molecules. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of 25943. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular 25943 protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-25943 antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with a 25943 immunogen. The anti-25943 antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized 25943. If desired, the antibody molecules directed against 25943 can be isolated from the mammal (*e.g.*, from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the anti-25943 antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46;

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), the more recent human B cell hybridoma technique (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) or trioma techniques. The technology for producing monoclonal antibody hybridomas is well known (see generally Kenneth, R.H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E.A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Gefter, M.L. *et al.* (1977) *Somat. Cell Genet.* 3:231-36). Briefly, an immortal cell line (typically a myeloma) is fused to lymphocytes (typically splenocytes) from a mammal immunized with a 25943 immunogen as described above, and the culture supernatants of the resulting hybridoma cells are screened to identify a hybridoma producing a monoclonal antibody that binds 25943.

Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating an anti-25943 monoclonal antibody (see, *e.g.*, Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; and Kenneth (1980) *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (*e.g.*, a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, *e.g.*, the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind 25943, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-25943 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display library) with 25943 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind 25943. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT International Publication WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *BioTechnology* 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Biotechnology (NY)* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554.

Additionally, recombinant anti-25943 antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the methods of the invention. Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* 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.*

WO 03/038113

PCT/US02/34730

- (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S.L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent No. 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

An anti-25943 antibody can be used to detect 25943 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the 25943 protein. Anti-25943 antibodies can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, *e.g.*, to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (*i.e.*, physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -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}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

VII. Electronic Apparatus Readable Media and Arrays

Electronic apparatus readable media comprising 25943 sequence information is also provided. As used herein, "25943 sequence information" refers to any nucleotide and/or amino acid sequence information particular to the 25943 molecules of the present invention, including but not limited to full-length nucleotide and/or amino acid sequences, partial nucleotide and/or amino acid sequences, polymorphic sequences including single nucleotide polymorphisms (SNPs), epitope sequences, and the like. Moreover, information "related to" said 25943 sequence information includes detection of the presence or absence of a sequence (*e.g.*, detection of expression of a sequence, fragment, polymorphism, etc.), determination of the level of a sequence (*e.g.*, detection of a level of expression, for example, a quantitative detection), detection of a reactivity to a sequence (*e.g.*, detection of protein expression and/or levels, for example, using a sequence-specific

WO 03/038113

PCT/US02/34730

antibody), and the like. As used herein, "electronic apparatus readable media" refers to any suitable medium for storing, holding, or containing data or information that can be read and accessed directly by an electronic apparatus. Such media can include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and
5 magnetic tape; optical storage media such as compact discs; electronic 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 recorded thereon 25943 sequence information of the present invention.

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

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
20 generate manufactures comprising the 25943 sequence information.

A variety of software programs and formats can be used to store the sequence information on the electronic apparatus readable medium. For example, the sequence information can be represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and Microsoft Word, represented in the form of an ASCII file, or
25 stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like, as well as in other forms. Any number of dataprocessor structuring formats (*e.g.*, text file or database) may be employed in order to obtain or create a medium having recorded thereon the 25943 sequence information.

By providing 25943 sequence information in readable form, one can routinely
30 access the sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the sequence information in readable form to compare a target sequence or target structural motif with the sequence information stored within the data storage means. Search means are used to identify fragments or regions of the sequences of the invention which match a particular target sequence or target motif.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

The present invention therefore provides a medium for holding instructions for performing a method for determining whether a subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder, wherein the method comprises the steps of determining 25943 sequence information associated with the subject and based on the 25943 sequence information, determining whether the subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder, and/or recommending a particular treatment for the disease, disorder, or pre-disease condition.

The present invention further provides in an electronic system and/or in a network, a method for determining whether a subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a disease associated with 25943 wherein the method comprises the steps of determining 25943 sequence information associated with the subject, and based on the 25943 sequence information, determining whether the subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 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.

The present invention also provides in a network, a method for determining whether a subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder associated with 25943, said method comprising the steps of receiving 25943 sequence information from the subject and/or information related thereto, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to 25943 and/or a 25943 associated disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 25943 information (*e.g.*, sequence information and/or information related thereto), and the acquired information, determining whether the subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder or pre-disease condition.

The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder, said method comprising the steps of receiving information related to 25943 (*e.g.*, sequence information and/or information related thereto), receiving

WO 03/038113

PCT/US02/34730

phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network related to 25943 and/or related to a 25943 associated disease or disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 25943 information, and the acquired information, determining whether the subject has a 25943 associated disease or disorder or a pre-disposition to a 25943 associated disease or disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the disease, disorder or pre-disease condition.

The invention also includes an array comprising a 25943 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 25943. This allows a profile to be developed showing a battery of genes specifically expressed in one or more tissues.

In addition to such qualitative determination, the invention allows the quantitation of gene expression. Thus, not only tissue specificity, but also the level of expression of a battery of genes in the tissue is ascertainable. Thus, genes can be grouped on the basis of their tissue expression *per se* and level of expression in that tissue. This is useful, for example, in ascertaining the relationship of gene expression between or among tissues. Thus, one tissue can be perturbed and the effect on gene expression in a second tissue can 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.

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 25943 associated disease or disorder, progression of 25943 associated disease or disorder, and processes, such a cellular transformation associated with the 25943 associated disease or disorder.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

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 25943 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.

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 25943) that could serve as a molecular target for diagnosis or therapeutic intervention.

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

EXAMPLES

EXAMPLE 1: MEASUREMENT OF GLYCOSYLASPARAGINASE ACTIVITY (METHOD 1)

This example describes methods for determining the activity of a glycosylasparaginase molecule, *e.g.*, a 25943 molecule. The methods are performed according to Noronkoski, T. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:26295-26297, incorporated herein by reference.

Materials

25943 may purified to homogeneity from 25943 expressing cells according to the methods of Mononen, I. *et al.* (1995) *FASEB J.* 9:428-433 and Kaartinen, V. *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:5860-5869, incorporated herein by reference. The purification protocol includes caprylic acid precipitation, affinity chromatography with concanavalin A lectin, gel filtration, hydrophobic interaction chromatography, and anion exchange chromatography. The fractions containing 25943 activity are pooled, and the purity of the preparation is estimated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, using standard methods. β -Aspartame and β -aspartylglycine may be purchased from Bachem Feinchemikalien AG (Bubendorf, Switzerland). Other peptides are prepared as described in Hanson, R.W. and Rydon, H.N. (1964) *J. Chem. Soc.* 115:836-842 and Cohen-Anisfeld, S.T. and Lansbury, P.T., Jr. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:10531-10537,

WO 03/038113

PCT/US02/34730

incorporated herein by reference. H-Ser-HN₂ and other amides are created as described in Hanson and Rydon (1964) *supra* and Fastrez, J. and Fersht, A.R. (1973) *Biochemistry* 12:2025-2034, incorporated herein by reference. β -Glycosylamine (1-amino-N-acetylglucosamine; GlcNAc-NH₂), β -aspartylglucosamine (GlcNAc-Asn), and aspartic acid β -methyl ester (H-Asp(OMe)-OH) are from Sigma (St. Louis, MO).

Enzyme Assays

Glycosylasparaginase activity of 25943 is measured with a fluorometric method using AspAMC as a substrate (Mononen, I. *et al.* (1993) *Anal. Biochem.* 208:372-374, incorporated herein by reference). The kinetic parameters for glycosylasparaginase catalyzed hydrolysis of β -aspartyl compounds are determined with a spectrophotometric assay (Tarantino, A.L. and Maley, F. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130:295-303; Noronkoski, T. and Mononen, I. (1997) *Glycobiology* 7:217-220). The least square Lineweaver-Burk analysis is used in the determination of Michaelis constant (K_m) and maximum reaction velocity (V_{max}).

Assay of β -Aspartyl Peptides

Formation of β -aspartyl peptides during their 25943 catalyzed synthesis is measured as described in Mononen, I. *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218:510-513, incorporated herein by reference. Various amounts of β -aspartyl donors and β -aspartyl acceptors are incubated in the presence of 25943 in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at 37°C. Aliquots of the incubation mixture are injected onto an HPLC column, and the formation of β -aspartyl peptides is measured. High performance liquid chromatography is performed as described in Mononen *et al.* (1996) *supra* using a 250 X 4.6 mm (inner diameter) amino column (Spherisorb-NH₂, 5 μ m particles), isocratic elution with 2.5 mM KH₂PO₄/acetonitrile (40/60 v/v, pH 4.6), flow rate 1 ml/min and detection wavelength 214 nm.

EXAMPLE 2: MEASUREMENT OF GLYCOSYLASPARAGINASE ACTIVITY (METHOD 2)

This example describes methods for determining the activity of a glycosylasparaginase molecule, *e.g.*, a 25943 molecule. The methods are performed

WO 03/038113

PCT/US02/34730

according to Noronkoski, T. *et al.* (1997) *FEBS Lett.* 412:149-152, incorporated herein by reference.

Materials

5 25943 may be purified as described above in Example 4. Total protein is determined using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, U.S.A.). Aspartylglucosamine, phenylisothiocyanate, and carboxymethyl cysteine are products of Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A. Asparagine and aspartic acid may be purchased from E. Merck, Darmstadt, Germany. All other reagents are of
10 analytical grade and are used without further purification. High-performance liquid chromatography (HPLC) is carried out with a Merck/Hitachi L-6200 liquid chromatograph (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). The column is Spherisorb S3 ODS2 (150 X 4.6 mm, internal diameter) (Phase Separations Ltd., Deeside, U.K.).

15 Enzyme Assay

 The assay for glycosylasparaginase activity is based on HPLC analysis of the reaction components GlcNAc-Asn, Asn and Asp after their phenylisothiocyanate (PITC) derivitization (Mononen, I.T. *et al.* (1993) *Anal. Biochem.* 208:372-374; Ebert, R.F. (1986) *Anal. Biochem.* 154:431-435; incorporated herein by reference). Carboxymethyl cysteine
20 (CmCys) is used as an internal standard. The kinetic and inhibition constants are determined at 22°C, and the incubation mixture contains various amounts of GlcNAc-Asn and/or Asn, 0.8 mM CmCys, and 25943 in 50 mM sodium-potassium phosphate buffer, pH 7.5 in a total volume of 50 µl.

25 EXAMPLE 3: MEASUREMENT OF GLYCOSYLASPARAGINASE ACTIVITY (METHOD 3)

 This example describes methods for determining the activity of a glycosylasparaginase molecule, *e.g.*, a 25943 molecule. The methods are performed according to Liu, Y. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 6:527-536, incorporated herein by
30 reference.

 Glycosylasparaginase activity is assayed by measuring the release of N-acetylglucosamine from the substrate N⁴-(β-N-acetylglucosaminy)-L-asparagine (GlcNAc-Asn) (Bachem, Torrance, CA, U.S.A.) (Tollersrud, O.K. and Aronson, N.N., Jr.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

(1989) *Biochem. J.* 260:101-108). Reactions with 2.5 mM substrate in 20 μ l of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, are incubated with 25943 for appropriate times at 37°C and stopped by boiling for 3 minutes after adding 50 μ l of 250 mM sodium borate buffer, pH 8.8. Released N-acetylglucosamine is assayed by the Morgan-Elson reaction. One
5 unit of 25943 liberates 1 μ mol of N-acetylglucosamine per minute.

EXAMPLE 4: PURIFICATION OF 25943 FROM Sf9 CELLS

The following methods are performed according to Liu, Y. *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271:527-536, incorporated herein by reference. 25943 is cloned into an appropriate
10 vector and expressed in Sf9 insect cells. The cells are spin cultured in 10 liters of HyQ CCM-3 medium (Hyclone Lab. Inc., Logan, UT, U.S.A.) to a final cell density of 1.75×10^6 /ml with a viability of 99%. Cells are collected at 4°C by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The cell pellet is washed once with phosphate buffered saline (PBS) and then resuspended in 50 ml of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing
15 0.15 M NaCl. Cells are homogenized by sonication followed by centrifugation at 15,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The cell lysate supernatant is subjected to chromatography in the cold on concanavalin A Sepharose (Sigma) equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.15 M NaCl. Non-binding proteins are washed from the column using 300 ml buffer, and bound glycosylated proteins are eluted by 0.2 M methyl
20 α -mannoside (Sigma). Eluted 25943 is concentrated to about 20 ml in an Amicon ultrafiltration cell fitted with a YM-10 membrane (Amicon Corp., Danvers, MA, U.S.A.). The sodium phosphate buffer is changed to 0.02 M Tris-HCl, pH 8.5, by three repeated ultrafiltrations. The concentrated 25943 sample is applied to a DE52-cellulose (Whatman Laboratory Division, Maidstone, England) anion-exchange column that has been pre-
25 equilibrated with 0.02 M Tris-HCl, pH 8.5. The column is eluted at 0.5 ml/minute with a 400 ml linear NaCl gradient (0-0.4 M in the same Tris buffer). Four ml fractions are collected, and those that contain 25943 are combined, concentrated to 3 ml and subjected to gel filtration on Sephadex G-150-120 (Sigma) equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 5.5. The column is run at 0.25 ml/min and 2.5 ml fractions are
30 collected. Fractions containing 25943 are combined and concentrated to 3 ml with a YM-10 membrane. This sample is subjected to CM52-cellulose (Whatman) cation-exchange chromatography on a column equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 5.5. 25943 is eluted by 100 ml of the same buffer containing a linear NaCl gradient from 0 to

WO 03/038113

PCT/US02/34730

0.4 M. The column is run at 0.25 ml/minute and 2 ml fractions are collected. 25943 fractions are combined and concentrated to 1 ml by Centricon 10 ultrafiltration (Amicon Corp.).

5 **EXAMPLE 5: SOFT AGAR ASSAY FOR ANCHORAGE-INDEPENDENT GROWTH OF CELLS**

Base Agar

1% Agar (DNA grade) is melted in a microwave and cooled to 40°C in a waterbath. 2X RPMI medium + 20% fetal calf serum (FCS) is also warmed to 40°C in a waterbath. Equal volumes of the two solutions are mixed to give 0.5% Agar + 1X RPMI + 10% FCS. 1.5ml is poured into each 35 mm Petri plate and allowed to set. The plates can be stored at 4°C for up to 1 week.

Top Agar

15 0.7% Agarose (DNA grade) is melted in a microwave and cooled to 40°C in a waterbath. 2X RPMI + 20% FCS is also warmed to the same temperature.

Cells

The cells (*e.g.*, breast, ovary, lung, or colon cells) to be assayed are trypsinized, suspended in medium, and counted. A positive control, such as a ras transformed cell line, should always be used. The concentration of the cell suspension is adjusted to 200,000 cells/ml.

Plating and staining

25 0.1ml of cell suspension is added to 10 ml capped centrifuge tubes. The 35 mm Petri plates containing the base agar are removed from 4°C about 30 minutes prior to plating to allow them to warm up to room temperature. 3ml 2X RPMI + 10% or 20% FCS and 3 ml 0.7% Agarose are added to each tube of cell suspension and mixed gently. 1.5 ml of this mixture is added to each replicate plate (each plate is done in triplicate), and the agarose is allowed to solidify. The plates are incubated at 37°C in humidified incubator for 10 - 14 days. After completion of the incubation period, the plates are stained with 0.5 ml of 0.005% Crystal Violet for at least 1 hour. The colonies are then counted using a dissecting microscope.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

**EXAMPLE 6: FLUORIMETRIC ASSAY FOR GLYCOSYLASPARAGINASE
ACTIVITY IN SERUM, PLASMA, OR LYMPHOCYTES**

This example describes methods for determining the activity of a glycosylasparaginase molecule, *e.g.*, a 25943 molecule, from the serum, plasma, or lymphocytes of a subject. The methods are performed according to Mononen, I. *et al.* (1994) *Clin. Chem.* 40:385-388, incorporated herein by reference.

Materials

The substrate AspAMC and the standard 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) may be purchased from Bachem AG, Bubendorf, Switzerland. Ficoll-Paque is purchased from Pharmacia, Uppsalla, Sweden. All other reagents are of analytical grade and are used without further purification.

Samples

Serum and plasma samples, as well as cultured fibroblast cell lines, are obtained from subjects. Lymphocytes are isolated by density gradient centrifugation with Ficoll-Paque according to the manufacturer's instructions. Samples are stored frozen at -20°C until analysis.

Effect of hemoglobin and bilirubin concentration

The presence of hemoglobin and/or bilirubin in the incubation mixture has a considerable inhibitory effect on the glycosylasparaginase activity. Accordingly, the measurements are compared to standards of hemoglobin and/or bilirubin concentrations.

Blood samples are hemolyzed by freezing 10 ml for 24 hours, and then thawing. Serum is separated after centrifugation at 3000 g for 10 minutes and mixed with normal serum in different ratios. The hemoglobin concentration is determined according to the method of Ferencz, A. and Basco, M. (1983) *Clin. Chem.* 134:103-106.

Glycosylasparaginase activity

The glycosylasparaginase activity of 25943 is assayed in plasma or serum by incubating 100 µl of AspAMC (10 mmol/L in ethylene glycol) and 90 µl of Tris-HCl buffer (50 mmol/L, pH 7.5) containing 10 ml/L ethylene glycol for 60-240 minutes at 37°C. Lymphocyte glycosylasparaginase activity is measured with 0.5 mmol/L substrate

WO 03/038113

PCT/US02/34730

in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, containing 10 ml/L ethylene glycol in a final volume of 200 μ l (Mononen, I.T., *et al.* (1993) *Anal. Biochem.* 208:372-374). Fluorescence is measured with an IL Multistat III Plus fluorescence centrifugal analyzer (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA) at 350 nm (excitation) and 450 nm (emission).

- 5 Glycosylasparaginase activity in plasma and serum is expressed as mU/L. The activity in lymphocytes is expressed as mU/g protein. One unit of glycosylasparaginase liberates 1 μ mol of AMC from the substrate per minute at 37°C. Protein is determined with a protein assay kit (Bio-Rad Labs, Richmond, CA) and a Kone Compact clinical analyzer (Kone Instruments, Espoo, Finland).

10

EXAMPLE 7: FLUORIMETRIC ASSAY FOR GLYCOSYLASPARAGINASE ACTIVITY (METHOD 4)

This example describes methods for determining the activity of a glycosylasparaginase molecule, *e.g.*, a 25943 molecule or a 25943 modulator. The methods are performed according to Mononen, I.T. *et al.* (1994) *Analytical Biochem.* 208:372-374, incorporated herein by reference.

15

Materials

- 20 AspAMC and AMC are from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland). 5-Diazo-4-oxo-L-norvaline, specific inhibitor of glycosylasparaginase (Kaartinen, V. *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:5860-5869), is synthesized according to the methods of Handschumacher, R.E. *et al.* (1968) *Science* 161:62-63.

Biological Samples

- 25 Leukocytes are isolated from 10 ml of blood as described in Kaartinen, V. and Mononen, I. ((1990) *Anal. Biochem.* 190:98-101) and suspended, like fibroblasts isolated from tissue culture plates, in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.2% Triton X-100 and 0.5 mM EDTA.

30 Assay

The fluorometric glycosylasparaginase assay is conducted at 37°C using 1 mM substrate in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.2% ethylene glycol in a total volume of 100 μ l. The release of 7-amino-4-methylcoumarin is measured fluorometrically using an

WO 03/038113

PCT/US02/34730

IL Multistat III plus fluorescence centrifugal analyzer (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). Excitation and emission wavelengths are 350 and 450 nm, respectively. For the calibration graph, the substrate is replaced by various concentrations of AMC. All the enzyme activity is expressed as $\mu\text{U}/\text{mg}$ protein, where one unit indicates the enzyme amount causing the liberation of one micromole of AMC per minute at 37°C. Total protein concentration is determined using a Bio-Rad protein assay reagent kit.

EXAMPLE 8: TISSUE EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN 25943 mRNA USING TAQMAN ANALYSIS

This example describes the tissue distribution of human 25943 mRNA, as determined using the TaqMan™ procedure. The Taqman™ procedure is a quantitative, reverse transcription PCR-based approach for detecting mRNA. The RT-PCR reaction exploits the 5' nuclease activity of AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase to cleave a TaqMan™ probe during PCR. Briefly, cDNA was generated from the samples of interest and used as the starting material for PCR amplification. In addition to the 5' and 3' gene-specific primers, a gene-specific oligonucleotide probe (complementary to the region being amplified) was included in the reaction (*i.e.*, the Taqman™ probe). The TaqMan™ probe included the oligonucleotide with a fluorescent reporter dye covalently linked to the 5' end of the probe (such as FAM (6-carboxyfluorescein), TET (6-carboxy-4,7,2',7'-tetrachlorofluorescein), JOE (6-carboxy-4,5-dichloro-2,7-dimethoxyfluorescein), or VIC) and a quencher dye (TAMRA (6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine) at the 3' end of the probe.

During the PCR reaction, cleavage of the probe separated the reporter dye and the quencher dye, resulting in increased fluorescence of the reporter. Accumulation of PCR products was detected directly by monitoring the increase in fluorescence of the reporter dye. When the probe was intact, the proximity of the reporter dye to the quencher dye resulted in suppression of the reporter fluorescence. During PCR, if the target of interest is present, the probe specifically annealed between the forward and reverse primer sites. The 5'-3' nucleolytic activity of the AmpliTaq™ Gold DNA Polymerase cleaved the probe between the reporter and the quencher only if the probe hybridized to the target. The probe fragments were then displaced from the target, and polymerization of the strand continued. The 3' end of the probe was blocked to prevent extension of the probe during PCR. This process occurred in every cycle and did not interfere with the exponential

WO 03/038113

PCT/US02/34730

accumulation of product. RNA was prepared using the trizol method and treated with DNase to remove contaminating genomic DNA. cDNA was synthesized using standard techniques. Mock cDNA synthesis in the absence of reverse transcriptase resulted in samples with no detectable PCR amplification of the control gene confirms efficient removal of genomic DNA contamination.

The expression of human 25943 mRNA was examined in various cell types and tissues. As shown in Table 1, 25943 is highly expressed in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), kidney, normal skin, normal brain cortex, hypothalamus, ovary tumor, lung tumor, and erythroid cells. Table 1 also demonstrates that the expression of 25943 is upregulated in ovary tumors, as compared to normal ovary tissue; upregulated in colon tumors, as compared to normal colon tissue; and upregulated in lung tumors, as compared to lung tissue under conditions of chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

15 **EXAMPLE 9: EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN 25943 mRNA IN COLON CANCER USING TAQMAN AND IN SITU ANALYSIS**

This example describes the expression of human 25943 mRNA in various colon tumors and cell lines, as determined using the TaqMan™ procedure (described above) and *in situ* hybridization analysis.

20 For *in situ* analysis, various tumors and normal tissues were first frozen on dry ice. Ten-micrometer-thick sections of the tissues were postfixed with 4% formaldehyde in DEPC-treated 1X phosphate-buffered saline at room temperature for 10 minutes before being rinsed twice in DEPC 1X phosphate-buffered saline and once in 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 8.0). Following incubation in 0.25% acetic anhydride-0.1 M triethanolamine-HCl for 10 minutes, sections were rinsed in DEPC 2X SSC (1X SSC is 25 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate). Tissue was then dehydrated through a series of ethanol washes, incubated in 100% chloroform for 5 minutes, and then rinsed in 100% ethanol for 1 minute and 95% ethanol for 1 minute and allowed to air dry.

Hybridizations were performed with ³⁵S-radiolabeled (5 X 10⁷ cpm/ml) cRNA probes. Probes were incubated in the presence of a solution containing 600 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.01% sheared salmon sperm DNA, 0.01% yeast tRNA, 0.05% yeast total RNA type X1, 1X Denhardt's solution, 50% formamide, 10% dextran

WO 03/038113

PCT/US02/34730

sulfate, 100 mM dithiothreitol, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 0.1% sodium thiosulfate for 18 hours at 55°C.

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

TaqMan - solid tumors

The expression of human 25943 was examined in solid human colon tumors. As shown in Table 2, 25943 expression is upregulated in 3/4 colon tumors, as compared to normal colon tissue. 25943 expression is also upregulated in a colon metastasis to the liver, as compared to normal liver tissue.

The expression human 25943 was also examined in various solid human colon tumor at different stages of tumorigenesis. As shown in Tables 5 and 6 (which are duplicate analyses of the same tumor samples), 25943 is highly expressed in 2/2 adenomas (as compared to normal colon), in 1/5 stage B adenocarcinomas (as compared to normal colon), in 2/6 stage C adenocarcinomas (as compared to normal colon), and in 1/5 liver metastases (as compared to normal liver and normal colon).

The expression human 25943 was further examined in colon metastases to the liver. As shown in Table 7, 25943 is highly expressed in 4/17 metastases, as compared to normal liver and normal colon. 25943 is also highly expressed in one early stage adenocarcinoma sample, as compared to normal colon.

In situ hybridization - solid tumors

In situ hybridization analysis indicated that human 25943 was expressed in tumors (3/3 positive samples) and metastatic carcinomas (3/4 positive samples), but not in

WO 03/038113

PCT/US02/34730

dysplastic/adenoma (0/3 positive samples), normal colonic epithelium (0/3 positive samples), or normal liver (0/2 positive samples).

TaqMan - in vitro models

5 The expression of human 25943 was examined in a number of xenograft friendly colon tumor cell lines. These cell lines can produce tumors when injected into mice. As shown in Tables 3 and 4, 25943 is highly expressed in DLD1 (stage C) cells, SW620 (stage C) cells, and HCT116 cells.

10 The expression of human 25943 was also examined in synchronized colon tumor cells induced to enter the cell cycle. As shown in Table 9, expression of 25943 was not noticeably regulated in HCT 116 cells synchronized with Aphidicolin, which blocks at the G1 stage of the cell cycle. Expression of 25943 was unregulated in HCT 116 cells during progression through the cell cycle after synchronization with Nocodazole, which blocks at the G2/M stage of the cell cycle. Expression of 25943 was also upregulated in DLD1 cells
15 after synchronization with Nocodazole.

The expression of human 25943 was further examined in *in vitro* colon cancer models (Tables 8 and 10). Disruption of the k-ras gene in DLD1 colon cancer cells (samples 2-4, as compared to sample 1, in Table 8; samples 16-18, as compared to sample 14, in Table 10) and in HCT 116 cells (samples 6-9, as compared to sample 5, in Table 8; 20 samples 19-22, as compared to sample 15, in Table 10) resulted in the downregulation of the expression of 25943.

EXAMPLE 10: EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN 25943 mRNA IN OVARIAN CANCER USING TAQMAN AND IN SITU ANALYSIS

25 This example describes the expression of human 25943 mRNA in various ovarian tumors and cell lines, as determined using the TaqMan™ procedure and *in situ* hybridization analysis (as described above).

30 *Solid tumors*

The expression of human 25943 was examined in solid human ovarian tumors using Taqman analysis. As shown in Table 2, 25943 expression is strongly upregulated in 5/5 ovarian tumors, as compared to normal ovary.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

The expression of human 25943 was examined in solid human ovarian tumors using *in situ* hybridization analysis. Strong 25943 expression was seen in all ovarian tumors types examined (5/7 tumors total), including adenocarcinoma, clear cell carcinoma, and serous carcinoma, as compared to normal ovary.

5

TaqMan - cell lines and tumor models

The expression of human 25943 was examined in various ovarian tumor models. As shown in Table 11, 25943 expression is downregulated in response to the growth factors EGF (samples 2-4, as compared to sample 1) and Heregulin (samples 4-6, as compared to sample 1) in the ovarian cancer cell line SKOV3 in the absence of serum. A cisplatin resistant SKOV-3 variant shows similar downregulation for EGF (samples 8 and 10-12), but not for Heregulin (samples 8 and 13-15). This data indicates that 25943 expression may be regulated through the epidermal growth factor receptor (EGFR) family, which includes EGFR, Her2, Her3 and Her4.

15 The expression of human 25943 was also examined in xenograft friendly ovarian tumor cell lines and other ovarian tumor cell lines. As shown in Tables 3 and 4, 25943 is highly expressed in SKOV-3 cells and OVCAR-3 cells. As shown in Table 11, 25943 is highly expressed in SKOV-3 cells, cisplatin resistant SKOV-3 variant cells, A2780 cells, OVCAR-3 cells, MDA2774 cells, and DOV13 cells.

20 The expression of human 25943 was further examined in serum treated HEY ovarian cancer cells. The cells were serum starved for 24 hours, and time points were taken at 0, 1, 3, 6, 9, and 12 hours after the addition of 10% serum. c-myc protein is highly upregulated at 1 hour after addition of serum, and phosphorylated at 6 hours. As shown in Table 11, samples 28-33, 25943 expression is upregulated between 1 and 3 hours after treatment, and then downregulated between 6 and 12 hours, indicating regulation by c-myc.

30 The expression of human 25943 was also examined in SKOV-3 and cisplatin resistant SKOV-3 variant subcutaneous xenograft tumors in nude mice. As shown in Table 11 (samples 34-37), 25943 expression is strongly downregulated in the tumors, as compared to the parental cells grown on plastic.

Finally, 25943 expression of human 25943 is upregulated in 1/2 ovarian ascites samples, as compared to normal ovary (Table 11, samples 38-41).

WO 03/038113

PCT/US02/34730

**EXAMPLE 11: EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN 25943 mRNA IN LUNG
CANCER USING TAQMAN AND *IN SITU* ANALYSIS**

This example describes the expression of human 25943 mRNA in various lung tumors and cell lines, as determined using the TaqMan™ procedure and *in situ* hybridization analysis (as described above).

Solid tumors

The expression of human 25943 was examined in solid human lung tumors using Taqman analysis. As shown in Table 2, 25943 expression is upregulated in 4/6 lung tumors, as compared to normal lung. 25943 expression is also upregulated in a colon metastasis to the liver, as compared to normal liver.

The expression of human 25943 was examined in solid human lung tumors using *in situ* hybridization analysis. Moderate 25943 expression was seen 2/2 lung tumors, as compared to normal lung.

TaqMan - cell lines and tumor models

The expression of human 25943 was examined in xenograft friendly lung tumor cell lines. As shown in Tables 3 and 4, 25943 is highly expressed in NCIH125 cells, NCIH67 cells, A549 cells, and normal human bronchial epithelium cells (NHBE).

**EXAMPLE 12: EXPRESSION ANALYSIS OF HUMAN 25943 mRNA IN
BREAST CANCER USING TAQMAN AND *IN SITU* ANALYSIS**

This example describes the expression of human 25943 mRNA in various breast tumors and cell lines, as determined using the TaqMan™ procedure and *in situ* hybridization analysis (as described above).

Solid tumors

The expression of human 25943 was examined in solid human breast tumors using *in situ* hybridization analysis. Moderate 25943 expression was seen 2/2 breast tumors (invasive ductal carcinoma), as compared to normal breast.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

TaqMan - cell lines and tumor models

The expression of human 25943 was examined in xenograft friendly breast tumor cell lines. As shown in Tables 3 and 4, 25943 is highly expressed in MCF-7 cells, ZR75 cells, T47D cells, and SkBr3 cells.

5

Equivalents

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. Such equivalents are intended to be encompassed by the following

10 claims.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

What is claimed:

1. A method for identifying a compound capable of treating a cell proliferation disorder, comprising assaying the ability of the compound to modulate 25943 nucleic acid expression or 25943 polypeptide activity, thereby identifying a compound capable of treating a cell proliferation disorder.
2. A method for identifying a compound capable of modulating cellular proliferation comprising:
 - a) contacting a cell which expresses 25943 with a test compound; and
 - b) assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 25943 nucleic acid or the activity of a 25943 polypeptide, thereby identifying a compound capable of modulating cellular proliferation.
3. A method for modulating cellular proliferation in a cell comprising contacting a cell with a 25943 modulator, thereby modulating cellular proliferation in the cell.
4. The method of claim 2, wherein the cell is a breast cell, an ovarian cell, a lung cell or a colon cell.
5. The method of claim 3, wherein the 25943 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
6. The method of claim 3, wherein the 25943 modulator is capable of modulating 25943 polypeptide activity.
7. The method of claim 6, wherein the 25943 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
8. The method of claim 6, wherein the 25943 modulator is capable of modulating 25943 nucleic acid expression.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

9. A method for treating a subject having a cell proliferation disorder characterized by aberrant 25943 polypeptide activity or aberrant 25943 nucleic acid expression comprising administering to the subject a 25943 modulator, thereby treating said subject having a cell proliferation disorder.

5

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

10

11. The method of claim 9, wherein said 25943 modulator is administered in a pharmaceutically acceptable formulation.

12. The method of claim 9, wherein the 25943 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

15

13. The method of claim 9, wherein the 25943 modulator is capable of modulating 25943 polypeptide activity.

WO 03/038113

PCT/US02/34730

SEQUENCE LISTING

<110> Williamson, Mark
Rudolph-Owen, Laura A.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE
TREATMENT AND DIAGNOSIS OF CELLULAR PROLIFERATION DISORDERS
USING 25943

<130> MPI01-236

<150> 60/335,004

<151> 2001-10-31

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 1361
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 1
ggcggggctg agcggttttcg agccggcgctc ggggagcggc ggtaccgggc ggctcgggg 60
ctggctcgac ccagcttgag gtctcgccgt ccgctccctg cggtcgccg ggtccggcg 120
acatgaatcc catcgtagt gtccacggcg gcggagccgg tcccatctcc aaggatcgga 180
aggagcgagt gcaccaggcg atggtcagag ccgccaccgt gggctacggc atcctccggg 240
agggcgggag cgccgtggat gccgtagagg gagctgtcgt cggcctggaa gacgatcccg 300
agtccaacgc aggttgtggg tctgtcttga acacaaatgg tgaggttgaa atggatgcta 360
gtatcatgga tggaaaagac ctgtctgcag gagcagtgtc cgcagtcag tgtatagcaa 420
atcccattaa acttgcctcg ctgtctatgg aaaagacacc tcattgcttt ctgactgacc 480
aaggcgcgag cgagtttgca gcagctatgg gggttccaga gattcctgga gaaaaactgg 540
tgacagagag aaacaaaaag cgccctggaaa aagagaagca tgaaaaaggt gctcagaaaa 600
cagatttgca aaaaaacttg ggaacgtgg gtgctgttgc cttggaactg aaaggggaatg 660
tagctacgc aacctccaca ggcgttatcg ttaataaat ggtcgccgc gttggggact 720
caccgtgtct aggaagctgga ggttatgcc acaatgacat cggagccgtc tcaaccacag 780
ggcatgggga aagcatcctg aaggtgaacc tggctagact caccctgttc cacatagaac 840
aaggaaagac ggtagaagag gctgcggacc tatcgttggg ttatatgaag tcaagggtta 900
aaggttttag tggcctcatc gtggttagca aaacaggaga ctgggtggca aagtggacct 960
ccacctccat gccctgggca gccgccaagg acggcaagct gcacttcgga attgatcctg 1020
acgatactac tatcaccgac ctccctaaag ccgctggaag attgtattcc agatgctagc 1080
ttagaggtca agtacagtct cctcatgaga catagcctaa tcaattagat ctagaattgg 1140
aaaaattgtc ccgtctgtca cttgttttgt tgccttaata agcatctgaa tgtttgtgtg 1200
tggggcgggt tctgaagcga tgagagaaat gccgtatta ggaggattac ttgagccctg 1260
gaggtcaaaag ctgaggtgag ccatgattac tccactgcac tccagcctgg gcaacagagc 1320
caggccctgt atcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaggaa a 1361

<210> 2
<211> 308
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 2
Met Asn Pro Ile Val Val Val His Gly Gly Gly Ala Gly Pro Ile Ser
1 5 10 15
Lys Asp Arg Lys Glu Arg Val His Gln Gly Met Val Arg Ala Ala Thr
20 25 30
Val Gly Tyr Gly Ile Leu Arg Glu Gly Gly Ser Ala Val Asp Ala Val
35 40 45
Glu Gly Ala Val Val Ala Leu Glu Asp Asp Pro Glu Phe Asn Ala Gly

WO 03/038113

PCT/US02/34730

```

50          55          60
Cys Gly Ser Val Leu Asn Thr Asn Gly Glu Val Glu Met Asp Ala Ser
65          70          75          80
Ile Met Asp Gly Lys Asp Leu Ser Ala Gly Ala Val Ser Ala Val Gln
85          90          95
Cys Ile Ala Asn Pro Ile Lys Leu Ala Arg Leu Val Met Glu Lys Thr
100         105         110
Pro His Cys Phe Leu Thr Asp Gln Gly Ala Ala Gln Phe Ala Ala Ala
115         120         125
Met Gly Val Pro Glu Ile Pro Gly Glu Lys Leu Val Thr Glu Arg Asn
130         135         140
Lys Lys Arg Leu Glu Lys Glu Lys His Glu Lys Gly Ala Gln Lys Thr
145         150         155         160
Asp Cys Gln Lys Asn Leu Gly Thr Val Gly Ala Val Ala Leu Asp Cys
165         170         175
Lys Gly Asn Val Ala Tyr Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ile Val Asn Lys
180         185         190
Met Val Gly Arg Val Gly Asp Ser Pro Cys Leu Gly Ala Gly Gly Tyr
195         200         205
Ala Asp Asn Asp Ile Gly Ala Val Ser Thr Thr Gly His Gly Glu Ser
210         215         220
Ile Leu Lys Val Asn Leu Ala Arg Leu Thr Leu Phe His Ile Glu Gln
225         230         235         240
Gly Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Asp Leu Ser Leu Gly Tyr Met Lys
245         250         255
Ser Arg Val Lys Gly Leu Gly Gly Leu Ile Val Val Ser Lys Thr Gly
260         265         270
Asp Trp Val Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ser Met Pro Trp Ala Ala Ala
275         280         285
Lys Asp Gly Lys Leu His Phe Gly Ile Asp Pro Asp Thr Thr Ile
290         295         300
Thr Asp Leu Pro
305

<210> 3
<211> 1361
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (123)...(1049)

<400> 3
gggagggtg agcggtttcg agccggcggtc ggggagcggc ggtaccgggc ggctgcgggg 60
ctggctcgac ccagcttgag gtctcgcggt cgcgtctctg cggcgccctg ggaaccggcg 120
ac atg aat ccc atc gta gtg gtc cac gcc gcc gga gcc ggt ccc atc 167
Met Asn Pro Ile Val Val Val His Gly Gly Gly Ala Gly Pro Ile
1 5 10 15

tcc aag gat cgg aag gag cga gtg cac cag gcc atg gtc aga gcc gcc 215
Ser Lys Asp Arg Lys Glu Arg Val His Gln Gly Met Val Arg Ala Ala
20 25 30

acc gtg gcc tac gcc atc ctc cgg gag gcc ggg agc gcc gtg gat gcc 263
Thr Val Gly Tyr Gly Ile Leu Arg Glu Gly Gly Ser Ala Val Asp Ala
35 40 45

gta gag gga gct gtc gtc gcc ctg gaa gac gat ccc gag ttc aac gca 311
Val Glu Gly Ala Val Val Ala Leu Glu Asp Asp Pro Glu Phe Asn Ala

```

WO 03/038113

PCT/US02/34730

50	55	60	
ggg tgt ggg tct gtc ttg aac aca aat ggt gag gtt gaa atg gat gct			359
Gly Cys Gly Ser Val Leu Asn Thr Asn Gly Glu Val Glu Met Asp Ala			
65	70	75	
agt atc atg gat gga aaa gac ctg tct gca gga gca gtg tcc gca gtc			407
Ser Ile Met Asp Gly Lys Asp Leu Ser Ala Gly Ala Val Ser Ala Val			
80	85	90	95
cag tgt ata gca aat ccc att aaa ctt gct cgg ctt gtc atg gaa aag			455
Gln Cys Ile Ala Asn Pro Ile Lys Leu Ala Arg Leu Val Met Glu Lys			
100	105	110	
aca cct cat tgc ttt ctg act gac caa ggc gca gcg cag ttt gca gca			503
Thr Pro His Cys Phe Leu Thr Asp Gln Gly Ala Ala Gln Phe Ala Ala			
115	120	125	
gct atg ggg gtt cca gag att cct gga gaa aaa ctg gtg aca gag aga			551
Ala Met Gly Val Pro Glu Ile Pro Gly Glu Lys Leu Val Thr Glu Arg			
130	135	140	
aac aaa aag cgc ctg gaa aaa gag aag cat gaa aaa ggt gct cag aaa			599
Asn Lys Lys Arg Leu Glu Lys Glu Lys His Glu Lys Gly Ala Gln Lys			
145	150	155	
aca gat tgt caa aaa aac ttg gga acc gtg ggt gct gtt gcc ttg gac			647
Thr Asp Cys Gln Lys Asn Leu Gly Thr Val Gly Ala Val Ala Leu Asp			
160	165	170	175
tgc aaa ggg aat gta gcc tac gca acc tcc aca ggc ggt atc gtt aat			695
Cys Lys Gly Asn Val Ala Tyr Ala Thr Ser Thr Gly Gly Ile Val Asn			
180	185	190	
aaa atg gtc ggc cgc gtt ggg gac tca ccg tgt cta gga gct gga ggt			743
Lys Met Val Gly Arg Val Gly Asp Ser Pro Cys Leu Gly Ala Gly Gly			
195	200	205	
tat gcc gac aat gac atc gga gcc gtc tca acc aca ggg cat ggg gaa			791
Tyr Ala Asp Asn Asp Ile Gly Ala Val Ser Thr Thr Gly His Gly Glu			
210	215	220	
agc atc ctg aag gtg aac ctg gct aga ctc acc ctg ttc cac ata gaa			839
Ser Ile Leu Lys Val Asn Leu Ala Arg Leu Thr Leu Phe His Ile Glu			
225	230	235	
caa gga aag acg gta gaa gag gct gcg gac cta tcg ttg ggt tat atg			887
Gln Gly Lys Thr Val Glu Glu Ala Ala Asp Leu Ser Leu Gly Tyr Met			
240	245	250	255
aag tca agg gtt aaa ggt tta ggt ggc ctc atc gtg gtt agc aaa aca			935
Lys Ser Arg Val Lys Gly Leu Gly Gly Leu Ile Val Val Ser Lys Thr			
260	265	270	
gga gac tgg gtg gca aag tgg acc tcc acc tcc atg ccc tgg gca gcc			983
Gly Asp Trp Val Ala Lys Trp Thr Ser Thr Ser Met Pro Trp Ala Ala			
275	280	285	
gcc aag gac ggc aag ctg cac ttc gga att gat cct gac gat act act			1031
Ala Lys Asp Gly Lys Leu His Phe Gly Ile Asp Pro Asp Asp Thr Thr			
290	295	300	

WO 03/038113

PCT/US02/34730

```
atc acc gac ctt ccc taa gccgctggaa gattgtattc cagatgctag      1079
Ile Thr Asp Leu Pro  *
      305

cttagaggtc aagtacagtc tcttcatgag acatagccta atcaattaga tctagaattg 1139
gaaaaattgt cccgtctgtc acctgttttg ttgccttaat aagcatctga atgtttggtt 1199
gtggggcggg ttctgaagcg atgagagaaa tgcccgtatt aggaggatta cttgagccct 1259
ggaggtcaaa gctgaggtag gccatgatta ctccactgca ctccagcctg ggcaacagag 1319
ccaggccctg tatcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga aa      1361
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/038113 A3

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/68**,
G01N 33/53
- (21) International Application Number:
PCT/US2002/034730
- (22) International Filing Date: 29 October 2002 (29.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/335,004 31 October 2001 (31.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): MIL-
LENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 75
Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WILLIAMSON,
Mark [US/US]; 15 Stonecrest Drive, Saugus, MA 01906
(US). RUDOLPH-OWEN, Laura, A. [US/US]; 186
Arborway, Apt. 1, Jamaica Plain, MA 02130 (US).
- (74) Agent: BOSSONE, Steven, A.; Millinennium Pharma-
ceuticals, Inc., Legal Intellectual Property (OBW-16), 75
Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
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, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
29 January 2004
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2003/038113 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF CELLULAR PROLIFERATION
DISORDERS USING 25943

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the treatment and diagnosis of cellular proliferation disorders, including, but not limited to, breast cancer, ovarian cancer, lung cancer, and colon cancer. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a cellular proliferation disorders disorder or modulating cellular proliferation. The invention also provides a method for modulating cellular proliferation e.g., modulating cellular proliferation in a subject. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a cellular proliferation disorder characterized by aberrant 25943 polypeptide activity or aberrant 25943 nucleic acid expression.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/34730
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53 US CL : 435/6, 7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, MEDLINE, BIOSIS, BIOTECHNO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 2002/0038014 A1 (Meyers) 28 March 2002, see entire document, especially SEQ ID NO. 5.	1-13
A,E	US 2002/0173639 A1 (FRIDDLE et al.) 21 November 2002, see entire document.	1-13
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts as priority claim(s) 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 considered with one or more other such documents, such examination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 March 2003 (19.03.2003)		Date of mailing of the international search report 01 AUG 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Sean R McGarry Telephone No. (703) 308-0196

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 Q 1/68	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,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ポケットベル

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

(72)発明者 ルドルフオーウェン, ローラ エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02130, ジャマイカ プレイン, アーボーウェイ
186, アpartment 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA02 HA12
4B063 QA18 QQ27 QQ44 QR77 QS32
4C084 AA01 AA13 AA17 BA35 NA14 ZB262
4C085 AA13 DD62
4C086 AA01 EA16 NA14 ZB26