

(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2005-507665
(P2005-507665A)

(43) 公表日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68
A61K 38/00
A61K 39/395
A61K 45/00
A61K 48/00

F 1

C 12 Q 1/68
A 61 K 39/395
A 61 K 45/00
A 61 K 48/00
A 61 P 25/04

Z N A A
D
4 B 0 6 3
4 B 0 6 5
4 C 0 8 4

テーマコード(参考)

2 G 0 4 5
4 B 0 2 4
4 B 0 6 3
4 B 0 6 5
4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-539600 (P2003-539600)	(71) 出願人	500287639 ミレニアム・ファーマシューティカルズ・ インコーポレイテッド M I L L E N N I U M P H A R M A C E U T I C A L S, I N C.
(86) (22) 出願日	平成14年10月28日 (2002.10.28)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月20日 (2004.4.20)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/034567	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02003/037254		
(87) 国際公開日	平成15年5月8日 (2003.5.8)		
(31) 優先権主張番号	60/335,078		
(32) 優先日	平成13年10月31日 (2001.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 46566を用いた疼痛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、疼痛障害(炎症性疼痛、慢性疼痛および/または神経障害性の疼痛を含むが、これらに限定されない)の処置および診断のための方法および組成物に関する。本発明はさらに、疼痛障害を処置し得る化合物、または疼痛および/もしくは炎症応答を調節し得る化合物を同定するための方法を提供する。本発明はさらに、被験体において疼痛および/または炎症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46566ボリペプチド活性または異常な46566核酸発現によって特徴づけられる疼痛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】**

疼痛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、該方法は、46566核酸発現または46566ポリペプチド活性を調節する化合物の能力をアッセイし、それによって、疼痛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】

疼痛シグナル伝達機構を調節し得る化合物を同定するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 46566を発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程；ならびに
(b) 該試験化合物が、46566核酸の発現または46566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、疼痛シグナル伝達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】

細胞において疼痛シグナル伝達を調節するための方法であって、該方法は、細胞を46566調節因子と接触させ、それによって、該細胞において疼痛シグナル伝達を調節する工程を包含する、方法。

【請求項 4】

前記細胞が、脳細胞、ニューロン、または脊髄もしくは脊髄神経節由来の細胞からなる群より選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

前記46566調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

前記46566調節因子が、46566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46566調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記46566調節因子が、46566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46566ポリペプチド活性または異常な46566核酸発現によって特徴付けられる疼痛障害を有する被験体を処置するための方法であって、該方法は、該被験体に46566調節因子を投与し、それによって疼痛障害を有する該被験体を処置する工程を包含する、方法。

【請求項 10】

前記疼痛障害が、炎症性疼痛、慢性疼痛、神経障害性の疼痛、カウザルギー、纖維筋痛症、癌の疼痛、片頭痛／頭痛および組織疼痛を包含する、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記46566調節因子が、薬学的に受容可能な処方物で投与される、請求項9に記載の方法。

【請求項 12】

前記46566調節因子が、有機低分子、ペプチド、抗体またはアンチセンス核酸分子である、請求項9に記載の方法。

【請求項 13】

前記46566調節因子が、46566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】**

10

20

30

40

50

【0001】

本出願は2001年10月31日に出願され、その内容は本明細書中に参考として援用される米国仮出願番号60/335,078に対して優先権を主張する。

【0002】

疼痛は感覚ニューロンの小群の末端が有害な化学的、機械的、あるいは熱的刺激によって活性化される場合に開始される。侵害受容体と呼ばれるこれらのニューロンは組織損傷に関する情報を脊髄および脳内の疼痛を処理する中枢に伝達する (Fields, H. L. Pain, McGraw-Hill, New York, 1987)。

【0003】

一旦、侵害受容体が活性化されると、疼痛として知覚させるために脳へこの感覚を伝達する一連の出来事が生じる。このプロセスにおいて1つの重要な工程は、ニューロン内における活動電位の発生である。活動電位は軸索末端におけるカルシウムイオンの蓄積を生じる。このカルシウムの蓄積はシナプス内への神経伝達物質の放出および最終的に侵害受容体から脳への経路の中で次のニューロンへの疼痛に関する情報の伝達を誘発する。

【0004】

ニューロン内におけるカルシウムの恒常性はインパルスの正確な制御のためにきわめて重大である。活動電位が軸索の末端に到達すると、カルシウムはそれが除去され得るよりもさらに速い速度で細胞内へ進入する。これはシナプス内への神経伝達物質の放出を誘発する。この経路を調節するために、細胞がカルシウムイオンの細胞内濃度を制御する機構を持っていることが重大である。

【0005】

K^+ 依存性の Na^+ / Ca^{+2} 交換輸送体は、ほとんどの細胞型の原形質膜の輸送体である。この Na^+ / Ca^{+2} 交換活性は、特に一般的な興奮性の細胞ならびに特にニューロンに重要である。これらの細胞において、 K^+ 依存性の Na^+ / Ca^{+2} 交換輸送体は、 Na^+ 勾配および/または膜電位が通常よりも低い環境内で Ca^{+2} の恒常性の制御のために重大な役割を持っている。

【0006】

疼痛障害の有病率、ならびに効果的な治癒および早期の診断の欠如を考慮すると、その発症前のマーカーとして働き得、そしてこれらの障害を処置および/または治癒するための治療剤を同定する方法として働き得る方法および組成物の多大な必要性が一般的に存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は疼痛障害の診断ならびに処置のための方法ならびに組成物を提供する。本発明は、46566 ($Na - Ca$ 交換輸送体 SLC8) が神経組織内 (脳、脊髄、ならびに後根神経節 (DRG)) で優勢に発現するという発見に少なくとも一部基づいている。本発明はまた、46566 遺伝子が完全フロイントアジュバント (CFA) ならびに軸索切断モデルとして公知の苦痛の動物モデルの脊髄において、ダウンレギュレートされるという発見に少なくとも部分的に基づいている。CFA モデルにおいて、CFA はげっ歯類の足またはサルの膝関節から注入され、その結果、有害な刺激に対する減少された域値 (痛覚過敏症) ならびに無害な刺激に対するより低い域値 (異痛症) として明示される変化した痛覚反応の発達を付随した炎症性反応を誘発する。その軸索切断モデルは動物の坐骨神経の切断に関与し、その結果、神経障害性の疼痛を誘発する。

【0008】

ある局面では、その発明は疼痛障害、たとえば炎症性の疼痛、慢性の疼痛、および/または神経障害性の疼痛などを処置することが出来る化合物を同定する方法を提供する。本方法は46566 核酸発現または46566 ポリペプチド活性を調節するその化合物の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、核酸発現または46566 ポリペプチド活性を調節するその化合物の能力は、細胞内での $Na - Ca$ 活性の変化を検出する

10

20

30

40

50

かまたは細胞内のカルシウムレベルを検出することによって決定される。

【0009】

別の局面では、本発明は疼痛および/または炎症を調節することができる化合物を同定する方法を提供する。本方法は46566核酸またはポリペプチドを発現する細胞、例えばニューロンを試験化合物と接触させること、ならびにその試験化合物が46566核酸の発現または46566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。

【0010】

さらに別の局面では、本発明は細胞内での疼痛シグナル伝達機構を調節する方法を特色とする。本方法は細胞、例えばニューロンと有効量の46566調節因子、例えば抗46566抗体、配列番号2のアミノ酸配列を含む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%同一なアミノ酸配列を含む46566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46566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を接触させる工程を包含する。

【0011】

なお別の局面では、本発明は、疼痛障害を有する被験体、例えば異常な46566ポリペプチド活性または異常な46566核酸発現によって特徴づけられる疼痛障害を処置する方法を特徴とする。本方法はその被験体に治療に有効な量の46566の調節因子、例えば薬学的に受容可能な処方物または遺伝子治療ベクターを使用して、投与する工程を包含する。1つの実施形態では、その46566調節因子は低分子、抗46566抗体、配列番号2のアミノ酸配列を含む46566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%同一なアミノ酸配列を含む46566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46566核酸分子、配列番号1の核酸分子あるいはそのフラグメント、またはリボザイムであり得る。

【0012】

1つの実施形態では、その疼痛障害は炎症性の疼痛、慢性の疼痛および/または神経障害性の疼痛である。

【0013】

本発明の別の特徴ならびに利点は以下の詳細な記述および特許請求の範囲から明らかである。

【0014】

本発明は疼痛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46566が神経組織内（脳、脊髄、ならびに後根神経節（DRG））で優勢に発現するという発見に少なくとも一部に基づいている。本発明はまた、46566遺伝子が完全フロイントアジュバント（CFA）ならびに軸索切断モデルとして公知の苦痛の動物モデルの脊髄においてダウンレギュレートされるという発見に、少なくとも部分的にに基づいている。CFAモデルにおいて、CFAはげっ歯類の足またはサルの膝関節から注入され、その結果、有害な刺激に対する減少された域値（痛覚過敏症）ならびに無害な刺激に対するより低い域値（異痛症）として明示される変化した痛覚反応の発達を付随した炎症性反応を誘発する。その軸索切断モデルは動物の坐骨神経の切断に関与し、その結果、神経障害性の疼痛を誘発する。

【0015】

理論によって限定されることを意図しないが、46566分子は侵害受容経路に関与するニューロンの生理機能を調節するために重要であり得ると考えられる。46566が苦痛ならびに神経損傷後の炎症性モデルの脊髄においてダウンレギュレートされることを実証する証拠は、疼痛シグナル伝達機構におけるこの交換輸送体の多大な役割を示唆する。このように、46566分子は疼痛シグナル伝達機構に関与することにより、疼痛の誘発を調節し得、そして苦痛を制御しながらびに疼痛障害を処置するための診断標的および治療剤を提供し得る。

10

20

30

40

50

【0016】

本明細書で使用される場合、用語「疼痛シグナル伝達機構」は被験体、例えばヒトなどの哺乳動物における疼痛の発生および調節に関する細胞内機構、例えば有害な化学的、機械的、または熱的刺激によって誘発される疼痛を包含する。哺乳動物において、有害な化学的、機械的、または熱的刺激の初期検出（「侵害受容」と呼ばれるプロセス）は、多様式の侵害受容体と呼ばれる特定化された小直径の主要求心性ニューロンの末梢端に優勢に発生する。これらの求心性ニューロンは、中枢神経系に情報を伝達し、そして疼痛または不快の認知を喚起しながらびに適当な防御反射を開始する。

【0017】

本明細書で使用される場合、用語「疼痛障害」は、疼痛に関連するまたは疼痛によって誘発される疾患、および障害または状況を包含する。疼痛障害の例としては、関節炎、異痛症、異型三叉神経痛、三叉神経痛、身体表現性障害、知覚減退（*hypoesthesia*）、痛覚過敏症（*hyperalgesia*）、神経痛、神経炎（*neuritis*）、神経性の疼痛、痛覚脱失、有痛性感覺脱失、カウザルギー、坐骨神経痛障害、変形性関節症、纖維筋痛症（*fibromyalgia*）、内臓疾患、慢性疼痛障害、片頭痛、慢性疲労症、複雑局所疼痛症候群（*complex regional pain syndrome*）、神経ジストロフィー、足底部筋膜炎または癌に関連する疼痛が挙げられる。

【0018】

本明細書で使用される用語「疼痛障害」はまた、慢性的な疼痛および/または神経障害性の疼痛のような障害に従属的、すなわち慢性的な疼痛および/または神経障害性の疼痛のような障害によって影響されるあるいは誘発される状態または障害を包含する。そのような状態の例としては、*vasodilation*ならびに低血圧；例えばアルコール依存症のような習慣的な状況（例えば、*Hungund*ならびに*Basavarajappa*、（2000）、*Alcohol and Alcoholism* 35:126-133を参照）；または有害な効果が別の障害または損傷の結果となる状態、例えば多発性硬化症または脊髄損傷が挙げられる。

【0019】

本明細書で使用される場合、用語「疼痛」は認識され、ならびに被験体、例えばヒトのような哺乳動物において有害な化学的、機械的、または熱的刺激によって誘発される身体の感覚を包含する。疼痛は感覚ニューロンの小群の末梢端が有害な化学的、機械的、あるいは熱的刺激によって活性化される場合に開始される。侵害受容体と呼ばれるこれらのニューロンは組織障害に関する情報を脊髄および脳内の疼痛を処理する中枢に伝達する（*FIELDS, H. L. Pain, McGraw-Hill, New York, 1987*）。用語「疼痛」は腰痛症、例えば変形性関節症のような関節炎による疼痛、例えば膝の疼痛または手根管症候群のような関節痛、筋筋膜の疼痛、ならびに神経障害性の疼痛のような慢性的の疼痛を包含する。用語「疼痛」は、さらに筋肉疲労ならびに捻挫に関連した疼痛、歯痛、頭痛、手術に関連した疼痛またはさまざまな形態の組織損傷に関連した疼痛、例えば炎症、感染および虚血のような急性の疼痛を包含する。

【0020】

本明細書で交換可能に使用される場合、用語「46566活性」、「46566の生物学的活性」または「46566の機能的活性」は標準的技術によってインビボまたはインビトロによって決定されるような、46566応答性細胞または46566応答性組織または46566タンパク基質への46566タンパク質、46566ポリペプチドまたは46566核酸分子によって示される活性を包含する。46566活性は46566標的分子との結合のような直接的な活性であり得る。本明細書で使用される場合、「基質」または「標的分子」または「結合パートナー」は46566タンパク質が天然に結合するかまたは相互作用し、その結果46566媒介性機能、例えば疼痛のシグナル伝達機構の調節が達成される分子である。46566標的分子は非46566分子（例えば、NAD⁺、NADP⁺、もしくは他の捕因子、または疼痛シグナル伝達機構に関与する生化学的分子）、または46566分子あるいは46566ポリペプチドであり得る。そのような標的

10

20

30

40

50

分子の例としては、46566タンパク質と同じシグナル伝達経路におけるタンパク質、例えば疼痛シグナル伝達経路における46566タンパク質の上流（活性の刺激体または抑制体を含む）または下流に機能し得るタンパク質を包含する。あるいは、46566活性は46566タンパク質と46566標的分子との相互作用によって媒介される細胞内シグナル伝達活性のような間接的な活性である。46566のその生物学的な活性が本明細書で記載される。例えば、46566タンパク質は以下の活性の1つ以上を有する。：（1）例えばシグナル伝達カスケードにおける第二メッセンジャーとして使用される、細胞内でのCa²⁺産生の調節；（2）疼痛シグナル伝達機構の調節；（3）神経伝達物質放出の調節；（4）シナプス活性、例えば後天的シナプス活性の調節；（5）シグナル伝達カスケードにおける第二メッセンジャーとして使用されるための細胞内でのナトリウム交換の調節。

10

【0021】

本発明のさまざまな局面が以下の小区分においてさらに詳細に記載される。

【0022】

(I.スクリーニングアッセイ)

本発明は、調節因子、すなわち46566タンパク質と結合し、46566発現または46566活性に対して刺激効果または抑制効果を持ち、または46566標的分子の発現または活性に対して刺激効果または抑制効果を持つ候補化合物もしくは試験化合物また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46566アンチセンス分子）を同定するための方法（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともまた称される）を提供する。本明細書で記載されるアッセイを使用して同定された化合物は疼痛障害を処置するために有用であり得る。

20

【0023】

候補／試験化合物は、例えば、1)可溶性ペプチドのようなペプチド（Igテイルを有する融合タンパク質ならびに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. (1991) Nature 354: 82-84; Houghten, R.ら(1991) Nature 354: 84-86を参照せよ）ならびにD-配置および/またはL-配置のアミノ酸から作製されるコンビナトリケミストリーに由来する分子ライブラリーを含む；2)リン酸化ペプチド（たとえばランダムならびに部分的に変性した、直接リン酸化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を参照せよ）；3)抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、および単鎖抗体ならびにFab、Fab'、Fab発現ライブラリーフラグメント、および抗体のエピトープ結合性フラグメント）；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物ライブラリーから得られた分子）を包含する。

30

【0024】

本発明の試験化合物は当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれか（生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相ライブラリーまたは液相ライブラリー；デコンヴォルーションを必要とする合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティクロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法を含む）を使用して取得され得る。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定されるが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチドライブラリー、非ペプチドオリゴマーライブラリーまたは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）。

40

【0025】

分子ライブラリーの合成のための方法の実例は当該分野、例えばDewittら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909; Erbら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zucke

50

rmannら(1994)J. Med. Chem. 37: 2678; Chōら(1993)Science 261: 1303; Carrelら(1994)Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carrelら(1994)Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; ならびにGallopら(1994)J. Med. Chem. 37: 1233において見出される。

【0026】

化合物ライブラリーは溶液中で(例えばHoughten(1992)Biotechniques 13: 412-421)、またはビーズ上に(Lam(1991)Nature 354: 82-84)、チップス(Fodor(1993)Nature 364: 555-556)、細菌上に(Lander USP 5,223,409)、胞子上に(Lander USP'409)、プラスミド上に(Cullら(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869)またはファージ上に(ScottおよびSmith(1990)Science 249: 386-390; Devlin(1990)Science 249: 404-406; Cwirlaら(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 6378-6382; Felici(1991)J. Mol. Biol. 222: 301-310; Lander(前出))で提供され得る。

【0027】

1つの局面で、アッセイは46566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が試験化合物と接触され、そしてその試験化合物の46566活性を調節する能力が決定される細胞ベースのアッセイである。1つの好ましい実施形態では、46566タンパク質の生物学的に活性な部分は疼痛および/または炎症を調節し得るドメインまたはモチーフを包含する。試験化合物の46566活性を調節する能力を決定することは、例えば疼痛および/または炎症の調節をモニタリングすることによって達成され得る。例えばその細胞は哺乳動物起源であり得る。

【0028】

基質に対する46566の結合を調節するその試験化合物の能力もまた決定され得る。基質に対する46566の結合を調節するその試験化合物の能力を決定は、例えば、46566基質と46566の結合が複合体中の、標識された46566基質を検出することによって決定され得るように、46566基質を放射性同位元素、蛍光標識、または酵素標識で結合することによって達成され得る。あるいは、複合体中における46566基質との46566結合を調節する試験化合物の能力をモニタリングするために46566は放射性同位元素または酵素標識で結合され得る。試験化合物の46566との結合能力の決定は、例えば、その化合物と46566との結合が複合体中における標識された46566化合物を検出することによって決定され得るように、放射性同位元素または酵素標識とその化合物を結合することによって達成され得る。例えば、46566基質は直接的または間接的に¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで標識され得、そしてこの放射性同位元素が放射能排出の直接計測またはシンチレーション計測によって検出され得る。あるいは、化合物は酵素によって、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフオスファターゼ、またはルシフェラーゼで標識され得、そしてこの酵素標識は産物への適当な基質の転換の決定によって検出され得る。

【0029】

化合物が、任意の相互作用体(interactant)の標識化を有さない46566と相互作用する能力を、評価することもまた、本発明の範囲内である。例えば、microphysiometerを使用して、化合物または46566のいずれかの、標識化を有さない46566との化合物の相互作用を測定し得る。McConnell, H. M. ら(1992)Science 257: 1906-1912。本明細書中で使用される場合、「microphysiometer」(例えば、Cytosensor)は、光でアドレス可能な電位差測定センサー(LAPS)を使用して、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する、分析装置である。この酸性化速度の変化は、化合物と46566と

10

20

30

40

50

の間の相互作用の指標として使用され得る。

【0030】

軸索切断の後の背側神経節根 (D R G) において、46566 発現はダウンレギュレートされるので、疼痛および / または炎症を調節する化合物は、46566 発現を調節する能力により同定され得る。試験化合物が、46566 発現を調節するか否かを決定するためには、46566 を発現する細胞は、試験化合物に接触させられ、46566 発現を調節する試験化合物の能力は、46566 mRNA を測定すること（例えば、ノーザンプロットティング、定量的 PCR（例えば、TaqMan）または、インビトロ転写アッセイ）によって決定される。インビトロ転写アッセイを行うために、46566 の全長プロモーターおよびエンハンサーが、レポーター遺伝子（例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスクレーバー（CAT）または、ルシフェラーゼ）に連結され得、宿主細胞に導入され得る。次いで、この同じ宿主細胞が、試験化合物でトランスクレクトされ得るか、または試験化合物と接触される。試験化合物の効果は、レポーター遺伝子活性を試験し、このレポーター遺伝子活性を、試験化合物を含まない細胞におけるレポーター遺伝子活性と比較することによって測定され得る。レポーター遺伝子活性における増大または減少は、46566 発現の調節を示し、従って、試験化合物が疼痛および / または炎症を調節する能力の指標を示す。

【0031】

46566 活性を調節する化合物の同定に使用され得るアッセイは、また、疼痛および / または炎症を調節する化合物の能力を試験するアッセイを含む。疼痛および / または炎症を調節する試験化合物の能力は、損傷部位を取り囲む組織の炎症を調節するそれらの能力によって測定される。

【0032】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、このアッセイにおいて、46566 タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、試験化合物と接触され、この試験化合物が46566 タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力またはその活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力が決定される。本発明のアッセイにおいて使用される46566 タンパク質の好ましい生物学的に活性な部分は、非46566 分子との相互作用に関与するフラグメント（例えば、高い表面確率スコアを有するフラグメント）を含む。試験化合物の46566 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に決定され得る。46566 タンパク質が試験化合物に結合する能力の決定はまた、リアルタイム生体分子相互作用分析（BIA）（Sjolander, S. および Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345; Szabolcs (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705）のような技術を使用して達成され得る。本明細書中で使用される場合、「BIA」は、相互作用物質を何ら標識することなく、リアルタイムで生体特異的相互作用を研究するための技術である（例えば、BIAcore）。表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象における変化は、生体分子間のリアルタイム反応の指標として使用され得る。

【0033】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、46566 タンパク質またはその生物学的に活性な部分を46566 タンパク質と結合する周知の化合物と接触させてアッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および46566 タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程、えお包含し、ここで、46566 タンパク質と相互作用する試験化合物の能力を決定する工程は、46566 タンパク質が、46566 標的分子（例えば、46566 基質）へ優先的に結合するか、または46566 標的分子の活性を調節する能力を決定する工程を包含する。

【0034】

本発明の無細胞アッセイは、単離したタンパク質（例えば、46566 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使用法に従う。

10

20

30

40

50

単離し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場合、単離したタンパク質の膜結合形態が液体の状態を保つよう可溶化剤を利用することができる。このようないか溶化剤の例としては、以下のような非イオン性界面活性剤が挙げられる：n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、オクタノイル - N - メチルグルカミド、デカノイル - N - メチルグルカミド、T r i t o n (登録商標) X - 1 0 0 、 T r i t o n (登録商標) X - 1 1 4 、 T h e s i t (登録商標) 、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_n (I s o t r i d e c y p o l y (e t h y l e n e g l y c o l e t h e r)_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 - c h o l a m i d o p r o p y l) d i m e t h y l a m m i n i o] - 1 - p r o p a n e s u l f o n a t e) (C H A P S) 、3 - [(3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ] - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート (3 - [(3 - c h o l a m i d o p r o p y l) d i m e t h y l a m m i n i o] - 2 - h y d r o x y - 1 - p r o p a n e s u l f o n a t e) (C H A P S O) 、またはN - ドデシル = N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明の上記のアッセイ方法の1を超える実施形態において、4 6 5 6 6 または4 6 5 6 6 標的分子のいずれかを固定して、複合体化形態を、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分離することを容易にすること、ならびにこのアッセイの自動化に適合させることができ。試験化合物の4 6 5 6 6 タンパク質に対する結合、または試験化合物の存在下または非存在下における4 6 5 6 6 タンパク質と4 6 5 6 6 標的分子との相互作用は、反応物質を含むために適した任意の容器において達成され得る。このような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、タンパク質の一方または両方がマトリクスに結合することを可能にするドメインが付加された融合タンパク質が、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 / 4 6 5 6 6 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 / 標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ (S i g m a C h e m i c a l , S t . L o u i s , M O) 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に吸着され得る。次いで、これは、試験化合物と、または試験化合物および非吸着標的タンパク質もしくは4 6 5 6 6 タンパク質のいずれかと合わされ得、この混合物は、複合体形成をもたらす条件下で（例えば、塩およびp Hについての生理学的条件にて）インキュベートされ得る。インキュベートした後、そのビーズまたはマイクロタイタープレートウェルは洗浄されて、いずれの非結合成分も除去され、ビーズの場合にはマトリクスが固定化され、例えば、上記のように、複合体形成が直接的または間接的にのいずれかで決定される。あるいは、複合体は、マトリクスから解離され得、4 6 5 6 6 結合または活性のレベルが、標準的な技術を使用して決定される。

【0036】

タンパク質または細胞膜調製物をマトリクスに固定化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、4 6 5 6 6 タンパク質または4 6 5 6 6 標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビシンの結合を利用して固定化され得る。ビオチン化4 6 5 6 6 タンパク質または標的分子は、当該分野で公知の技術（例えば、ビオチン化キット、P i e r c e C h e m i c a l s , R o c k f o r d , I L ）を使用して、ビオチン - N H S (N - ヒドロキシ - スクシンイミド) から調製され得、ストレプトアビシンコーティング9 6 ウェルプレート (P i e r c e C h e m i c a l) のウェルに固定化され得る。あるいは、4 6 5 6 6 タンパク質または標的分子と反応するが、4 6 5 6 6 タンパク質のその標的分子に対する結合を妨害しない抗体は、そのプレートのウェルに誘導体化され得、非結合標的または4 6 5 6 6 タンパク質が、抗体結合によりウェル中に捕捉される。このような複合体を検出するための方法は、G S T 固定化複合体についての上記の方法に加えて、4 6 5 6 6 タンパク質または標的分子と反応する抗体を用いて、複合体を免疫検出すること、ならびに4 6 5 6 6 タンパク質または標的

分子に関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0037】

本発明のなあ別の局面において、46566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、46566と結合または相互作用し、46566活性に関与する他のタンパク質（「46566結合タンパク質」または「46566-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46566結合タンパク質は、例えば、46566媒介性シグナル伝達経路の下流エレメントのような、46566タンパク質または46566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46566結合タンパク質は、46566インヒビターである可能性がある。

【0038】

このツーハイブリッドシステムは、別個のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュラーの性質に基づく。ほとんどの転写因子は、。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、46566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オで相互作用して46566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46566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。

【0039】

別の局面において、本発明は、本明細書に記されているアッセイの二つ以上の組み合わせに関係する。例えば、調節剤は、細胞ベースのアッセイまたは無細胞アッセイを使用して同定され得、46566タンパク質の活性を調節する薬剤の能力は、例えば、慢性的な疼痛および/または神経障害性の疼痛の動物モデルのような動物において、インビオで確認され得る。

【0040】

さらに、本明細書に記載されるように同定された46566調節因子（例えば、アンチセンス46566核酸分子、46566特異的抗体、または小分子）は、そのような調節因子を用いる処置の有効性、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、本明細書に記載されるように同定された46566調節因子は、そのような調節因子の働きのメカニズムを決定するために、動物モデルにおいて使用され得る。

【0041】

疼痛を調節する所定の調節剤の能力は、以下の試験の任意の1つを用いることにより定量され得る：神経性の疼痛のモデルとしての密接なL6およびL7のライゲーション；長期的な炎症性の疼痛のモデルとして膝間接および後ろ足におこなう完全フロイントアジュバント（Palecek, J. (1992)Neurophysiol 68:1951-66）；神経ライゲーション（CCI）；熱性痛覚過敏、接触性異痛および低温異痛（Carlton, S. M.ら、(1994)Pain 56:155-66）；熱性後ろ足引

10

20

30

40

50

き込み潜伏時間 (thermal paw withdrawal latency) (Hargreaves test) ; フォン・フレイの機械的引き込み閾値 (von Frey mechanical withdrawal threshold) ; ホットプレート潜伏時間試験 ; テイルフリックアッセイ (the tail flick latency test) (Stone, S. M. ら (1997) NeuroReport 8 : 3131 - 3153) ; 温湯液浸テイルフリックアッセイ (Stone, L. S. ら (1997) NeuroReport 8 : 3131 - 3135) ; 坐骨神経挫傷試験 (De Konig ら (1986) J. Neurol. Sci. 74 : 237 - 246) ; 冷水異痛試験 (Hunter ら (1997) Pain 69 : 317 - 322) ; 後ろ足圧力潜伏時間アッセイ (Hakkai-Onen, S. ら (2001) Brain Research 900 (2) : 261 - 7 ; または放射熱試験 (Yoshimura, M. ら (2001) Pharm. Research 44 (2) : 105 - 11) 。 10

【 0042 】

簡単にいえば、タイルフリック潜伏時間試験は、動物の尻尾に光のビームを照射することに関係する。尻尾の温まり開始から時間を測定し、尻尾の振りの瞬間に停止する。代表的には、尻尾の振りの潜伏時間 (TFL) の 5 回の測定は、ラットあたり、期間あたり、 5 ~ 10 分間隔で試行して行われる。

【 0043 】

熱性後ろ足引き込み潜伏時間試験は、 Hargreaves 試験として知られており、下からラット右後ろ足の腹側表面に光線を照射し、足が光から反射的に離れるまでの時間を測定することを包含する。 20

【 0044 】

フォン・フレイの機械的引き込み閾値は、ラットをスクリーン表面に置き、フォーストランステューサーにフォン・フレイフィラメントを接触させることを含む。このフィラメントは、動物の腹側右後ろ足とに対して上方に圧力がかけられ、後ろ足を引き込めるときの力を測定する。

【 0045 】

ホットプレート潜伏時間試験は、ラットを熱した面に置き、ラットが跳躍または後ろ足をなめるのに要した時間を測定する。

【 0046 】

疼痛または炎症のための動物モデルはまた、以下の方法によって得られる：ホルマリン、 - カラゲーナン、マスタードオイル、または完全フロイントアジュバント (CFA) を動物の右後ろ足または膝への皮下注射であって、これは炎症性の疼痛を引き起こす；動物の坐骨神経の長期的な圧迫であって、これは、神経障害性の疼痛を引き起こす；動物への二塩化ジブチリンの注射であって、これは慢性臓炎の引き起こす；動物の坐骨神経または脛骨神経の軸索切除；または、動物の脊髄神経の長期的な圧迫であって、これは神経障害性の疼痛を引き起こす。 30

【 0047 】

Na - Ca 交換を調節するための所定の調節剤の能力は、カルシウム取り込みアッセイを用いることにより定量され得る。このアッセイは、 Wood ら (1988) J. Neurosci. 8 : 3208 - 3220 (これは、の全体が本明細書中で参考文献として援用される) で述べられているように、成体ラットの背側神経節根を用いて行われ、放射性 Ca の交換を試験する。 40

【 0048 】

(II . 予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験のモニタリングが予後 (予測) の目的のために使用され、それにより個体を予防的に処置する予防医療の分野に関する。結果的に、本発明の 1 つの局面は、生物学的サンプルの状況 (例えば、血液、血清、細胞または組織 (例えば、神経組織)) において、 46566 タンパクおよび / または 46566 核酸の発現ならびに 46566 活性を決定して、それにより個体が、疼痛に苦し 50

められるかどう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、疼痛障害を発症する危険性があるかどうか決定するための予後の（または、診断的）アッセイを提供する。例えば、46566遺伝子における変異は、生物学的サンプルにおいて、アッセイされ得る。そのようなアッセイは疼痛障害が発症する前に、個体を予防的に処置する、診断目的または予後目的のために使用され得る。

【0049】

本発明の別の局面は、臨床試験において、46566の発現または活性に対する46566調節因子（例えば、抗46566抗体、または46566リボザイム）の影響をモニタリングすることに関係する。

【0050】

これらおよび他の薬剤は、次の節でさらに詳細に記載される。

【0051】

(A. 疼痛障害のための診断的アッセイ)

被験体が疼痛障害に悩ませられているかどうかを決定すために、生物学的サンプルが被験体から得られ得、そしてこの生物学的サンプルは、生物学的サンプル中で、46566タンパクまたは46566タンパクをコードする核酸（例えば、mRNAまたはゲノムDNA）を検出可能な化合物または薬剤と接触され得る。46566mRNAまたはゲノムDNAを検出するための好ましい薬剤は、46566mRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る標識された核酸プローブである。核酸プローブは、例えば、配列番号1で示される46566核酸、またはその部分（例えば、ストリンジエントな条件下で46566mRNA、またはゲノムcDNAに特異的にハイブリダイズするに十分な、少なくとも15、20、25、30、40、45、50、100、250または500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチド）であり得る。

【0052】

サンプル中の46566タンパクを検出するための好ましい薬剤は、46566タンパクに結合し得る抗体、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、またはより好ましくはモノクローナルであり得る。インタクトな抗体、またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')2）が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識された」は、検出可能な基質をプローブまたは抗体に結合する（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブまたは抗体の直接標識、および直接標識される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含することを意図する。抗体または核酸プローブに連結され得る直接基質の例としては、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、蛍光標識した二次抗体を用いる一次抗体の検出、および蛍光標識したストレプトアビジンにより検出され得るように、ビオチンでDNAプローブを末端標識することが挙げられる。

【0053】

用語「生物学的サンプル」は、被験体から単離された組織、細胞および生物学的流体、、ならびに被験体中に存在する組織、細胞、および流体を含むことを意図する。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボにおいて、生物学的サンプル中の46566mRNA、タンパク、またはゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、46566mRNAの検出のためのインビトロの技術は、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を含む。46566タンパクの検出のためのインビトロの技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンプロット、免疫沈降、および免疫蛍光を含む。46566ゲノムcDNAの検出のためのインビトロの技術は、サザンハイブリダイザーションを含む。さらに、46566タンパクの検出のためのインビボの技術は、標識した46566抗体を被験体に導入することを含む。例えば、被験体中でのその存在および位置が放射性マーカーで標識され得るこの抗体は、標準的な画像化技術により検出され得る。

【0054】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、この方法は、コントロール生物学的サンプルを、コントロール被験体から得る工程、そのコントロールサンプルを、46566のタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が、生物学的サンプル中で検出されるように、化合物または、46566のタンパク質、mRNA、もしくはゲノムDNAを検出し得る薬剤と接触させる工程、およびそのコントロールサンプル中の46566のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と試験サンプル中の46566のタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程をさらに包含する。

【0055】

(B. 疼痛障害についての予後アッセイ)

本発明はさらに、疼痛障害（例えば、46566の異常な発現もしくは活性と関連する疼痛障害を有するかまたは疼痛障害を発症する危険性のある被験体を同定するための方法に関する。 10

【0056】

本明細書で使用される場合、用語「異常な」は、野生型46566の発現または活性からはずれた、46566の発現または活性を包含する。異常な発現または活性は、増大または減少した発現または活性、ならびに野生型発生発現パターンにも細胞内発現パターンにも従わない、発現または活性を包含する。例えば、46566の異常な発現または活性は、46566遺伝子における変異が、46566遺伝子を過少発現または過剰発現させる場合、およびそのような変異が、非機能的46566タンパク質または野生型様式にて機能しないタンパク質（例えば、46566基質と相互作用しないタンパク質または非46566基質と相互作用するタンパク質）を生じる状況を包含することが意図される。 20

【0057】

本明細書中に記載されるアッセイ（例えば、前述の診断アッセイまたは以下のアッセイ）は、疼痛障害（例えば、炎症性疼痛、慢性疼痛および/または、神経障害性疼痛）を有するかまたは疼痛障害を発症する危険性のあ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、被験体から得られ得、遺伝的改変の存在または非存在について試験され得る。例えば、このような遺伝的改変は、以下のうちの少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：1) 46566遺伝子からの1以上のヌクレオチドの欠失、2) 46566遺伝子への1以上のヌクレオチドの付加、3) 46566遺伝子の1以上のヌクレオチドの置換、4) 46566遺伝子の染色体再配置、5) 46566遺伝子のメッセンジャーRNA転写物レベルにおける改変、6) 46566遺伝子の異常な改変（例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの改変）、7) 46566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) 46566タンパク質の非野生型レベル、9) 46566遺伝子の対立遺伝子喪失、および10) 46566タンパク質の不適切な翻訳後修飾。 30

【0058】

本明細書中に記載されるように、46566遺伝子における遺伝的改変を検出するために使用され得る当該分野で公知の多数のアッセイがある。例えば、46566遺伝子における遺伝的改変は、アンカーPCRまたはRACE PCRのような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）において、あるいは連結連鎖反応（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）（このうち後者は、46566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））において、プローブ/プライマーを使用して検出され得る。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、核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNAまたはその両方）をそのサンプルから単離する工程、その核酸サンプルを、46566遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が発生するような条件下で、46566遺伝子に特異的にハイブリダイズする1以上のプライマーと接 40

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工程、あるいは増幅産物のサイズを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含する。PCRおよび/またはLCRは、本明細書中で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に関連した予備的な増幅工程として使用することが所望され得ることが理解される。

【0059】

代替的増幅方法としては、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-レプリカーゼ (Lizardi, P. M. ら (1988) Bio-Technology 6: 1197)、または任意の他の核酸増幅法、その後の当業者に周知の技術を用いる増幅分子の検出。これらの検出スキームは、核酸分子がごく少数で存在する場合に、このような分子の検出に特に有用である。

【0060】

代替的実施形態において、生物学的サンプル由来の46566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化により同定され得る。例えば、サンプルDNAおよびコントロールDNAは、単離され、(必要に応じて)増幅され、1以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、フラグメント長サイズがゲル電気泳動により決定され、比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長サイズにおける差異は、サンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム(例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと)の使用は、リボザイム切断部位の発生または喪失により、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。

【0061】

他の実施形態において、46566における遺伝的変異は、得られた生物学的サンプルおよびコントロール核酸(例えば、DNAまたはRNA)を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズさせることにより同定され得る(Cronin, M. T. ら (1996) Hum. Mutat. 7: 244-255; Kozal, M. J. ら (1996) Nat. Med. 2: 753-759)。例えば、46566における遺伝的変異は、Cronin, M. T. ら (1996)前出に記載される通りに光生成(light-generated)DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。簡潔には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイは、連続する、重複したプローブの線形アレイを作製することにより、サンプルおよびコントロール中のDNAの長いストレッチを介して走査して、配列間の塩基の変化を同定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。この工程の次に、検出された全ての改变体または変異に相補的な、より小さな、特定されたプローブアレイを使用することにより、特定の変異の特徴付けを可能にする第2のハイブリダイゼーションアレイが行われる。各変異アレイは、平行なプローブセット(一方は、野生型遺伝子に相補的であり、他方は、変異遺伝子に相補的である)から構成される。

【0062】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応は、生物学的サンプル中の46566遺伝子を直接配列決定し、生物学的サンプル中の46566の配列と、対応する野生型(コントロール)配列とを比較することにより、変異を検出するために使用され得る。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いたものが挙げられる。任意の種々の自動化配列決定手順が、質量分析法(例えば、PCT国際公開番号WO94/16101; Cohen ら (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127-162; およびGriffins ら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 12292-12296)により開発され得る。

993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159を参考のこと)による配列決定を含む、診断アッセイ(Naeve, 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。

【0063】

46566遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断剤からの保護がRNA/RNAまたはRNA/DNAへテロ二重鎖中のミスマッチした塩基を検出するために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46566配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルより得られた潜在的変異RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供することによって開始する。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重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理される。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ミウムで処理され得、そして、ミスマッチ領域を消化するために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により分離される。例えば、Cottonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; およびSaleebaら(1992)Methods Enzymol. 217: 286-295を参考のこと。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。

【0064】

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46566cDNA中の点変異を検出およびマッピングするために規定された系において二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)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(Hsul(1994)Carcinogenesis 15: 1657-1662)。例示的実施形態に従って、46566配列(例えば、野生型の46566配列)に基くプローブは、試験細胞からのcDNA産物または他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物は、存在する場合、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号を参考のこと。

【0065】

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、46566遺伝子における変異を同定する。例えば、一本鎖コンフォーメーション多型(SSCP)を使用して、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動的移動度の差異を検出し得る(Oritaら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766; Cotton(1993)Mutat. Res. 285: 125-144およびHayashi(1992)Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79もまた参考のこと)。サンプルおよびコントロールの46566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。アッセイの感度は、(DNAよりもむしろ)RNAを用いることにより増強され得る。RNAの二次構造は、配列の変化に対して、より敏感である。好ましい実施形態において、目的の方法は、電気泳動的移動度の変化に基いて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためにヘテロ二重鎖分析を利用する(Keenら(1991)Trends Genet. 7: 5)。

【0066】

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

10

【0067】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的增幅、または選択的プライマー伸長。例えば、既知の変異が中心におかれたオリゴヌクレオチドプライマーが調製され得、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に対してハイブリダイズさせ得(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。

20

【0068】

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、本発明と組合わせて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の変異を保有し得る(その結果、増幅は、差示的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989)Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)か、または適切な条件下で、ミスマッチが、ポリメラーゼ伸長を防ぎ得るかまたは低減し得る場合、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、切断ベース検出を行うために、変異領域中に新規の制限部位を導入することが、所望され得る(Gasperiniら(1992)Mol. Cell Probes 6:1)。

30

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もまた行われ得ることもが、明らかである(Barany(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。このような場合に、連結は、5'配列の3'末端で完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、これにより、増幅の存在または非存在を探索することによって特定の部位で既知の変異の存在を検出し得る。

30

【0069】

さらに、本明細書中に記載される予後アッセイを用いて、疼痛を有効に処置するための46566調節因子(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、または低分子)を被験体に投与され得るか否かを決定し得る。

40

【0070】

(C. 臨床試験の間の効果のモニタリング)

本発明は、被験体における疼痛障害の処置における46566調節因子(例えば、本明細書中で同定される46566調節因子)の有効性を決定するための方法をさらに提供する。例えば、46566遺伝子発現、46566タンパク質レベルを上昇させるか、または46566活性をアップレギュレートする際の46566調節因子の有効性は、46566遺伝子発現、46566タンパク質レベルの低下、または46566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、46566遺伝子発現、タンパク質レベルを低下させるか、または46566活性をダウンレギュレートする際の46566調節因子の有効性は、46566遺伝子発現、46566タンパ

50

ク質レベル、または46566活性の上昇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、46566遺伝子、および好ましくは、例えば、疼痛障害に関す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。

【0071】

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）46566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、46566を含む遺伝子が、同定され得る。よって、疼痛障害に罹患する被験者における46566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、46566および疼痛障害に関連する他の遺伝子の発現レベルについてそれぞれ分析され得る。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ザンプロット分析またはRT-PCRによって、あるいは本明細書中に記載されるような方法の1つによって産生されるタンパク質量を測定することによって、あるいは46566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。このようにして、遺伝子発現パターンは、細胞の、46566活性を調節する因子に対する生理学的応答を示すマーカーとして働き得る。よって、この応答状態は、個体を46566活性を調節する因子で処置する前、またはその処置の間の種々の時点で測定され得る。

【0072】

好ましい実施形態において、本発明は、46566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、この方法は、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46566タンパク質、46566mRNA、または46566ゲノムDNAの発現レベルを検出する工程；（iii）1つより多くの投与後サンプルを被験体から得る工程；（iv）これらの投与後サンプル中の46566タンパク質、46566mRNA、または46566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46566タンパク質、46566mRNA、または46566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46566タンパク質、46566mRNA、または46566ゲノムDNAの発現レベルまたは活性レベルと比較する工程；ならびに（vi）それによって被験体に対するこの因子の投与を変更する工程。例えば、因子の投与増加は、46566発現または46566活性を、検出されたレベルよりも高いレベルに上昇させるため（すなわち、この因子の有効性を増大させるため）に所望され得る。あるいは、因子の投与減少は、46566発現または46566活性を、検出されたレベルよりも低いレベルに低下させるため（すなわち、因子の有効性を減少させるため）に、所望され得る。このような実施形態に従って、46566発現または46566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。

【0073】

（I.I.I. 疼痛障害に罹患した被験体の処置法）

本発明は、炎症性痛覚、慢性疼痛、および/または神経因性疼痛（例えば、慢性疼痛障害、纖維筋痛症、偏頭痛/頭痛、癌疼痛、慢性疲労症候群、関節炎、複合領域疼痛症候群、カウザルギー、神経ジストロフィー、または足底筋膜炎）のような疼痛障害の危険性のある（または障害を罹患しそうな）被験体（例えば、ヒト）を処置する予防法および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」は、疾患もしくは障害、その疾患もしくは障害の症状、またはその疾患もしくは障害に対するリスク（または感受性）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、患者への治療剤の適用または投与、あるいはその疾患もしくは障害、その疾患もしくは障害の症状、またはその疾患もしくは障害に対するリスク（または感受性）を有する患者由来

10

20

30

40

50

の細胞もしくは組織への治療剤の適用または投与を含む。本明細書で使用される場合、「治療剤」としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：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。

【0074】

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) る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」）を決定するのかについての研究をいう。

【0075】

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 46566 分子または 46566 調節因子のいずれかを用いる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。

【0076】

(A. 予防法)

1つの局面において、本発明は、ある細胞内（例えば、神経細胞）で 46566 発現または 46566 活性を調節する因子を被験体に投与することによって、その被験体における疼痛障害を予防するための方法を提供する。疼痛障害を発現する危険性のある被験体は、例えば、本明細書中に記載される診断アッセイまたは予後アッセイのいずれかまたはその組合せによって、同定され得る。予防薬の投与は、異常な 46566 発現または活性に特徴的な症状の徴候の前に生じ得、その結果、疼痛障害が予防されるか、あるいはその進行において遅延される。46566 異常の型に依存して、例えば、46566 分子、46566 のアゴニスト剤または 46566 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。適切な薬剤は、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイに基いて決定され得る。

【0077】

(B. 治療法)

本発明の別の局面は、疼痛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、46566 発現もしくは 46566 活性を調節する薬剤（例えば、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）、またはこのような薬剤の組合せを、被験体に投与する工程を包含する。別の実施形態において、本方法は、減少した 46566 発現もしくは 46566 活性、または異常な 46566 発現もしくは 46566 活性、または所望されない 46566 発現もしくは 46566 活性を補うための治療剤として、46566 タンパク質または 46566 核酸分子を被験体に投与する工程を包含する。

【0078】

46566 活性の刺激は、46566 が異常にダウンレギュレートされる状況、および/または増加した 46566 活性が有利な効果を有しそうな状況において、所望される。同様に、46566 活性の阻害は、46566 が異常にアップレギュレートされる状況、および/または減少した 46566 活性が有利な効果を有しそうな状況において、所望される。

【0079】

46566 活性を調節する薬剤は、被験体への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、典型的には薬剤（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、

10

20

30

40

50

用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬剤投与に適合可能な溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれかおよび全てを含むことが意図される。このような媒体及び薬剤の、薬学的に活性な物質への使用は、当該分野において周知である。任意の慣用的な媒体または薬剤が活性化合物に適合し得ない場合を除いて、組成物におけるこれらの使用が意図される。補助的な活性化合物がまた、組成物中に組み込まれ得る。

【0080】

本発明の治療法において使用される薬学的組成物は、その意図される投与経路に適合性であるように処方される。投与経路の例としては、非経口投与（例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与）、経口投与（例えば、吸入投与）、経皮投与（局所投与）、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注入水、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重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、酢酸、クエン酸またはリン酸）および張性の調整のための因子（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジまたは複数用量のガラス製またはプラスチック製のバイアル中に封入され得る。

【0081】

注入可能な用途に適切な薬学的組成物としては、滅菌水溶液（水溶性の場合）または滅菌水性分散物、および滅菌注射溶液もしくは分散物の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる。静脈内投与について、適切なキャリアとしては、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、組成物は滅菌されていなければならず、そして容易な注射可能性が存在する程度に流体であるべきである。組成物は、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌のような微生物の夾雜作用に対して保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適切な混合物を含む、溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性が、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散物の場合に必要とされる粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用からの保護は、種々の抗菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなど）によって達成され得る。多くの場合において、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）を組成物中に含むことが、好ましい。注入可能な組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる因子（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を組成物中に含ませることによってもたらされ得る。

【0082】

滅菌注射溶液は、上記で列挙した成分の1つまたは組合わせとともに、46566活性を調節する因子（例えば、46566タンパク質のフラグメントまたは抗46566抗体）を適切な溶媒中に必要とされる量で組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、基本分散媒体および上記で列挙された成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌散剤の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、予め滅菌濾過したその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得る。

【0083】

経口組成物は、一般的に、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

10

20

30

40

50

カプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬 (m o u t h w a s h) としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ (s w i s h) 、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および / またはアジュvant材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、以下のいずれかの成分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、トラガカントガムまたはゼラチン）；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、P r i m o g e l、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S t e r o t e）；潤滑剤 (g l i d a n t)（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）；あるいは香味剤（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）。

10

【0084】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む加圧容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

20

【0085】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透される障壁に対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与としては、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、鼻スプレーまたは坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与については、この活性化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏 (o i n t m e n t)、軟膏 (s a l v e)、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

20

【0086】

46566活性を調節する因子はまた、直腸送達のための坐剤の形態（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤と共に）または停留浣腸の形態で調製され得る。

30

【0087】

1つの実施形態において、46566活性を調節する薬剤は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、徐放性処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。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、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当業者には明らかである。これらの材料はまた、A l z a C o r p o r a t i o n およびN o v a P h a r m a c e u t i c a l s , I n c . から商業的に入手可能である。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染された細胞に標的化されたリポソームを含む）がまた、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。

40

【0088】

投与の容易さおよび投薬の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な、物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと組み合せて、所望の治療的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。本発明の投薬単位形態についての詳細は、46566活性を調節する薬剤の固有の特性、および達成される特定の治療効果、ならびに被験体の処置のためのこのような薬剤を調合する当該分野に固有の制限によって決定され、そしてこれらに

50

直接依存する。

【0089】

このような薬剤の毒性および治療効率は、例えば、LD50（集団の50%に致死的な量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性と治療効果との間での用量比は、治療指數であり、そしてこれは、LD50/ED50比として表され得る。大きな治療指數を示す薬剤が好ましい。毒性の副作用を示す薬剤が使用され得るが、治療は、感染していない細胞に対する可能性のある損傷を最少にし、それによって副作用が減少するように、患部組織の部位に対してそのような薬剤を標的化する送達システムを設計するように、注意すべきである。

10

【0090】

細胞培養アッセイおよび動物実験によって得られたデータは、ヒトでの使用のための投与量の範囲を処方する際に使用され得る。このような46566調節剤の投与量は、好ましくは、わずかな毒性を有するかまたは毒性を全く有さないでED50を含む、循環濃度の範囲内である。投与量は、使用される投与量形態および利用される投与の経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の治療方法において使用される任意の薬剤については、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に概算され得る。用量は、細胞培養で決定されるような、IC50（すなわち、症状の最大の半分の抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む、循環血漿濃度の範囲を達成するように、動物モデルにおいて処方され得る。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中でのレベルは、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。

20

【0091】

本明細書中に規定されるように、タンパク質またはポリペプチドの治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、約0.001~30mg/kgペイン（pain）、好ましくは約0.01~25mg/kgペイン、より好ましくは約0.1~20mg/kgペイン、およびさらにより好ましくは約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kg、または5~6mg/kgペインの範囲である。疾患または障害の重篤度、事前の処置、被験体の一般的な健康状態および／もしくは年齢、ならびに他の疾患の存在を含むがこれらに限定されない特定の要因が、被験体を効果的に処置するために必要とされる投与量に影響を与えることが、当業者に明らかである。さらに、治療有効量のタンパク質、ポリペプチドまたは抗体での被験体の処置は、単回の処置を含み得るか、または好ましくは、一連の処置を含み得る。

30

【0092】

好ましい例においては、被験体は、約0.1~20mg/kgペインの範囲の抗体、タンパク質またはポリペプチドを用いて、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、およびさらにより好ましくは約4、5、または6週間の間、1週間に1回、処置される。処置のために使用される抗体、タンパク質またはポリペプチドの有効投与量が、特定の処置の過程にわたって増大し得るかまたは減少し得ることもまた、明らかである。投与量の変化が生じ得、そして本明細書中に記載されているような診断アッセイの結果から明白となる。

40

【0093】

本発明は、46566発現または46566活性を調節する薬剤を含む。薬剤は、例えば、低分子であり得る。例えば、このような低分子としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：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10,000g/mol未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物（すなわち、ヘテロ有機化合物および有機金属化合物を含む）、約5,000g/mol未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、約1,000g/mol未満の分子量を有する有機化合物または無機化合物、ならびにこのような化合物の塩、エステル、および薬学的に受容可能な他の形態。低分子薬剤の

50

適切な用量が当該分野の医師、獣医師または研究者の知識内の多くの要因に依存することが、理解される。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個性、サイズおよび状態に依存して、適用可能な場合、この組成物が投与される経路、およびこの低分子が有していることを開業医が所望する、本発明の核酸またはポリペプチドに対する効果にさらに依存して、変化する。代表的な用量は、被験体またはサンプル重量 1 kg あたり mg または μ g の量の低分子を含む（例えば、約 1 μ g / kg ~ 約 500 mg / kg 、約 100 μ g / kg ~ 約 5 mg / kg 、または約 1 μ g / kg ~ 約 50 mg / kg）。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対するこの低分子の効力に依存することがさらに理解される。このような適切な用量は、本明細書中で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 1 つ以上が、46566 ポリペプチドまたは核酸の発現または活性を調節するために、動物（例えば、ヒト）に投与される場合、医師、獣医または研究者は、例えば、初めに比較的低い用量を処方し、続いて、適切な応答が得られるまで、この用量を増加し得る。さらに、任意の特定の動物被験体についての特定の用量レベルは、用いられる特定の化合物の活性、被験体の年齢、疼痛（pain）、身体全体の健康状態、性別および食餌、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物の組合せ、ならびに調節されるべき発現または活性の程度を含む種々の因子に依存することが、理解される。10

【0094】

さらに、抗体（またはそのフラグメント）は、治療部分（例えば、細胞毒、治療剤または放射性金属イオン）に結合体化され得る。細胞毒または細胞毒性剤は、細胞に有害な任意の薬剤を含む。例としては、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセン（anthracin）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、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、およびこれらのアナログまたはホモログが挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファン、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、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシン C、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および抗分裂薬剤（例えば、ビンクリスチン、ビンプラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。20

【0095】

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、腫瘍壞死因子、-インターフェロン、-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子）；または生物学的応答改変因子（例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、あるいは他の増殖因子が挙げられ得る。30

【0096】

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, Rei

10

20

30

40

50

s f e l d 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)、Robinsons 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」; 10 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「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」 Immunol. Rev. 62: 119~58 (1982) 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され得る。 20

【0097】

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が組換え細胞からインタクトで產生され得る場合 (例えば、レトロウイルスベクター)、その薬学的調製物は、遺伝子送達系を產生する1つ以上の細胞を含み得る。 30

(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、46566活性を調節する薬剤を投与するか否か、ならびに46566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。 40

【0098】

薬理ゲノム学は、罹患した個人における変化した薬物の性質および異常な作用に起因する、薬物に対する応答における臨床学的に有意な遺伝的変動を取り扱う。例えば、Eichelbaum, M. ら、(1996) Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 23 (10~11): 983~985 および Linder, M. W. ら、(1997) Clin. Chem. 43 (2): 254~266 を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学的条件は、区別され得る。遺伝的条件は、薬物が身体に作用する様式を変更する (変化した薬物作用) 単一因子として伝達したか、または遺伝的条件は、身体が薬物に作用する様式を変更する (変化した薬物代謝) 単一因子として伝達した。これらの薬理ゲノム学的条件は、稀な遺伝子欠損または天然に存在する多型のいずれかとして、存在し得る。例えば、グルコース-6-リン酸アミノペプチダーゼ欠損 (G6PD) は、一 50

一般的な遺伝性酵素病であり、その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。

【0099】

「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の多型部位または可変部位からなり、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遺伝子マップは、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II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、数千万個の公知の一塩基多型（SNPs）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共通の変化である。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マップを考慮すると、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特性を考慮して、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。

10

20

30

40

【0100】

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46566タンパク質）、その遺伝子の共通のすべての改変体は、その集団においてかなり容易に同定され得、そして別の遺伝子バージョンに対する1つの遺伝子バージョン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。

【0101】

例示的実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および持続時間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（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））で発現される。PMの有病率は、集団毎に異なる。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場合に、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な、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。

【0102】

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46566分子または46566調節因子）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したか否かの指標を与え得る。

【0103】

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

50

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、46566活性を調節する薬剤で、疼痛を伴う疾患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。

(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、46566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可能である、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、およびエピソーム性哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中に導入された際に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、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可能である。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。

【0104】

本発明の方法において使用される組換え発現ベクターは、宿主細胞中の核酸の発現に適切な形態の、本発明の核酸を含む。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、Goedde1(1990)MethodsEnzymol.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、46566タンパク質、46566タンパク質の変異体形態、融合タンパク質など)を产生し得る。

【0105】

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46566タンパク質の発現のために設計され得る。例えば、46566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、Goedde1(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。

10

20

30

40

50

【0106】

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性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溶解度を増大させること；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と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、およびそれらのコグネイト認識配列は、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。

10

20

30

40

【0107】

精製融合タンパク質は、46566活性アッセイ(例えば、以下に詳細に記載される直接的アッセイまたは競合アッセイ)において、または46566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46566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。

【0108】

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。

30

【0109】

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)。

【0110】

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、(このDNA分子の転写による)46566mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の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(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)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

50

グされる核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得るか、またはアンチセンス RNA の構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する調節配列が、選択され得る。このアンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であり得、この中でアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で生成され、その活性は、ベクターが導入される細胞型により決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、Weintraub, H.ら, *Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1 (1) 1986 を参照のこと。

【0111】

10

本発明の別の側面は、本発明の 46566 核酸分子（例えば、組換え発現ベクター内の 46566 核酸分子、もしくはその宿主細胞のゲノムの特定の部位へ 46566 核酸分子が相同組換えするのを可能にする配列を含む 46566 核酸分子）が導入されてい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、本明細書中で互換可能に使用される。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫もしくは潜在的子孫もまた指すと理解される。特定の改変が、変異もしくは環境的影響のいずれかに起因して次の世代に生じ得るので、このような子孫は、実際には、その親細胞と同一でないかもしれないが、本明細書中で使用される用語の範囲内にお含まれる。

【0112】

20

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、46566 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）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0113】

30

ベクター DNA は、従来の形質転換技術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」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらの技術としては、リン酸カルシウム共沈または塩化カルシウム共沈、DEAE デキストラノ媒介性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが挙げられる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0114】

40

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、46566 タンパク質を生成（すなわち、発現）するため使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して 46566 タンパク質を生成するための方法を提供する。1つの実施形態において、本方法は、本発明の宿主細胞（この細胞中に、46566 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）を適切な培地中で培養し、その結果 46566 タンパク質を生成する工程を、包含する。別の実施形態において、本方法はさらに、その培地またはその宿主細胞から 46566 タンパク質を単離する工程を包含する。

【0115】

50

（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 46566 遺伝子の cDNA 配列およびヒト 46566 ポリペプチドの推定アミノ酸配列は、図 1A ~ 1B および配列番号 1 および 2 にそれぞれ示される。ヒト 2047 遺伝子の 5' 非翻訳領域も 3' 非翻訳領域も含まないコード領域が、配列番号 3 に

示される。

【0116】

本発明の方法は、46566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、および46566をコードする核酸分子（例えば、46566mRNA）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のために十分な核酸フラグメント、および46566核酸分子を増幅または変異誘発するための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作製されたDNAアナログまたはRNAアナログを包含することを意図される。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。

10

【0117】

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のヌクレオチド配列、またはその部分を有する核酸分子）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、46566核酸分子を、（例えば、Sambrook, J. Fritsch, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されるような）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。

20

【0118】

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。

【0119】

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、46566ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを、標準的な合成技術によって（例えば、自動DNA合成機を使用して）、調製し得る。

30

【0120】

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1に示されるヌクレオチド配列の相補体、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の部分を含む。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。

40

【0121】

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、またはこのヌクレオチド配列の任意の部分に、少なくとも約55%、60%、65%、70%、75%、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%以上同一であるヌクレオチド配列を含有する。

【0122】

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46566タンパク質の部分（例えば、46566タンパク質の生物学的に活性な部分）をコード

50

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、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改変体または変異体のうちの少なくとも約12個または15個、好ましくは約20個または25個、より好ましくは約30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、65個または75個連続したヌクレオチドに、ストリンジエントな条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。1つの実施形態において、本発明の方法において使用される核酸分子は、50、50～100、100～200、200～300、300～400、400～500、500～600、600～700、700～800、800～900、900～1000、1000～1100ヌクレオチド以上の長さであり、10 かつストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1の核酸分子にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列を含む。

【0123】

本明細書中で使用される場合、用語「ストリンジエントな条件下でハイブリダイズする」は、お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、お互いにハイブリダイズしたままである、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、互いに少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、なにより好ましくは少なくとも約85%または90%同一な配列が、互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。このようなストリンジエントな条件は、当業者に公知であり、そして Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc. (1995), 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エントな条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら、Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), 7章、9章および11章に見出され得る。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例としては、約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)中のハイブリダイゼーション(または約42～50での、4×SSC+50%ホルムアミド中の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。ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件のより好ましい非限定的な例としては、45での、6×SSC中でハイブリダイゼーション、次いで約65での、0.2×SSC、0.1%SDS中で1回以上の洗浄が挙げられる。高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例としては、約65～70での、1×SSC中での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中での1回以上の洗浄が挙げられる。減少したストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件の好ましい非限定的な例としては、約50～60での、4×SSCまたは6×SSC中のハイブリダイゼーション(または約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中で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)が、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中でSSC(1×SSCは、0.15M NaClおよび1.5mM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に対するハイブリダイゼーション温度は、その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 は以下の式に従って決定される。 $18 \text{ 塩基対長} = 2(A + T \text{ 塩基の数}) + 4(G + C \text{ 塩基の数})$ 。 $18 \text{ 塩基対長} + 49 \text{ 塩基対長} \text{ であるハイブリッドについて、} T_m() = 2(A + T \text{ 塩基の数}) + 4(G + C \text{ 塩基の数})$ 。20304050

= 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[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もまた当業者によって認識され、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、またはサケもしく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、特にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件のさらなる好ましい非限定的な例としては、約65での、0.25~0.5M NaH₂PO₄、7% SDS中のハイブリダイゼーション、次いで65での、0.02M NaH₂PO₄、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)を参照のこと)。

10

20

30

40

【0124】

好ましい実施形態において、プローブは、そのプローブに結合した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、46566タンパク質を誤発現する(misexpress)細胞または組織を(例えば、被験体由来の細胞のサンプル中の46566コード核酸のレベルを測定すること、例えば、46566mRNAレベルを検出するか、またはゲノムの46566遺伝子が変異されているか除去されているかを測定することによって)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。

20

【0125】

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46566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。

30

【0126】

本発明の方法は、ヒト46566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、46566の活性を維持するヒト46566タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。機能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のみ、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、46566活性を有さないヒト46566タンパク質の天然に存在するアミノ酸配列改変体である。非機能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における置換、挿入、または欠失を含む。

40

【0127】

本発明の方法は、ヒト46566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46566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46566の活性を有する、タンパク質である。

40

【0128】

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せずに46566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

50

ために必要とされる。例えば、本発明の 4 6 5 6 6 タンパク質の間で保存されたアミノ酸残基および短鎖脱水素酵素ファミリーの他のメンバーは、変化を受容する可能性は低い。

【 0 1 2 9 】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発および P C R 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 つ以上の推定非必須アミノ酸残基でなされる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるアミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該分野において規定されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、- 分枝鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。従って、好ましくは、4 6 5 6 6 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 (s a t u r a t i o n m u t a g e n e s i s) によって、4 6 5 6 6 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、4 6 5 6 6 の生物学的活性についてスクリーニングされ得る。配列番号 1 の変異誘発の後、コードされたタンパク質が、組換え発現され得、そしてそのタンパク質の活性が、本明細書中に記載されたアッセイを用いて決定され得る。

【 0 1 3 0 】

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して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 c D N A 分子のコード鎖に相補的であるかまたは m R N A 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 4 6 5 6 6 コード鎖またはそ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、4 6 5 6 6 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」に対して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、4 6 5 6 6 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」に対して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 ' 非翻訳領域および 3 ' 非翻訳領域ともいう）。

【 0 1 3 1 】

本明細書中に開示される 4 6 5 6 6 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、W a t s o n および C r i c k 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、4 6 5 6 6 m R N A の全コード領域に相補的であり得るが、より好ましくは、4 6 5 6 6 m R N A のコード領域または非コード領域の一部のみに対してアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、4 6 5 6 6 m R N A 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 ヌクレオチド長、1 0 ヌクレオチド長、1 5 ヌクレオチド長、2 0 ヌクレオチド長、2 5 ヌクレオチド長、3 0 ヌクレオチド長、3 5 ヌクレオチド長、4 0 ヌクレオチド長、4 5 ヌクレオチド長または 5 0 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

10

20

30

40

50

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、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシルキュオシン、イノシン、N 6 - 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、N 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、- D - マンノシルキュオシン、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 - N 6 - 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 (w y b u t o x o s i n e) 、プソイドウラシル、キュオシン、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、(a c p 3) w および 2 , 6 - ジアミノプリン。あるいは、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクローニングされた発現ベクターを使用して、生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写される RNA は、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向であり、これは、次の小節においてさらに記載される。)

本発明の方法において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、またはこれらのアンチセンス核酸分子が、46566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 とハイブリダイズするか、または結合することによって、例えば、転写および / または翻訳を阻害することによって、タンパク質の発現を阻害するように、インサイチュで產生される。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り得るか、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においては、その二重らせんの大きい方の溝における特異的相互作用を介し得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接注射が挙げられる。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。全身投与に関して、例えば、細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に、アンチセンス核酸分子を連結することによって、このアンチセンス分子が、選択された細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これらのアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中で記載されるベクターを使用して、細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力な pol I I プロモーターまたは pol I I I プロモーターの制御下に配置されるベクター構築物が、好みしい。

【 0 1 3 2 】

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アンチセンス核酸分子は、- アノマー核酸分子である。- アノマー核酸分子は、相補的 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 - ユニットとは対照的に、鎖は互いに対し平行に走る (Gaultierら (1987) Nucleic Acids Res. 15 : 6625 - 6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2 ' - o - メチルリボヌクレオチド (Inoueら (1987) Nucleic Acids Res. 15 : 6131 - 6148) またはキメラ RNA - DNA アナログ (Inoueら (1987) FEBS Lett. 215 : 327 - 330) を含み得る。

【 0 1 3 3 】

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アンチセンス核酸分子は、

リボザイムである。リボザイムは、単鎖核酸を切斷し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子（例えば、相補的な領域を有するmRNA）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（HaseloffおよびGerlach（1988）Nature 334: 585-591に記載されている））は、46566 mRNA転写物を触媒により切斷するために使用され得、これにより、46566 mRNAの転写を阻害する。46566コード核酸に対して特異性を有するリボザイムは、本明細書に開示される46566cDNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1）に基づいて設計され得る。例えば、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が46566コードmRNAにおいて切斷されるべきヌクレオチド配列に対して相補的であるように構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参考のこと。あるいは、46566 mRNAを使用して、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartel, D. およびSzostak, J. W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照のこと。

10

【0134】

あるいは、46566遺伝子の発現は、標的細胞中で46566遺伝子の転写を防ぐ三重ヘリックス構造を形成するために、46566の調節領域に相補的なヌクレオチド配列（例えば、46566プロモーターおよび/またはエンハンサー）を標的することによって阻害され得る。一般に、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, C. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; およびMaher, L. J. (1992) Bioassays 14(12): 807-15を参考のこと。

20

【0135】

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た46566核酸分子を、塩基部分、糖部分またはホスフェート骨格において改変し、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を改善し得る。例えば、核酸分子のデオキシリボースホスフェート骨格は、ペプチド核酸を生成するために改変され得る (Hyrup B. およびNielsen, P. E. (1996) Bioorg. Med. Chem. 4(1): 5-23を参考のこと)。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースホスフェート骨格が偽ペプチド骨格により置換され、そして4つの天然の核酸塩基 (nucleobase) のみが保持されている核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいう。PNAの中性の骨格は、低イオン強度の条件下で、DNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にし得ることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup B. およびNielsen (1996) 前出、およびPerry-O'Keefe (1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675に記載のような、標準的固相ペプチド合成プロトコルを使用して実施され得る。

30

【0136】

46566核酸分子のPNAは、本明細書中に記載される治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、遺伝子発現の配列特異的調節（例えば、転写または翻訳の停止を誘導すること、または複製を阻害することによる）のためのアンチセンス剤またはアンチジーン (antigene) 剤として使用され得る。46566核酸分子のPNAはまた、（例えば、PNA指向PCRクランピング (PNA-directed PCR clamping) による）遺伝子内の一塩基対変異の分析において、他の酵素（例えば、S1ヌクレアーゼ (Hyrup およびNielsen (1996) 前出)）と組み合わせて使用される場合の「人工制限酵素」として；またはDNA配列決定またはハイブリダイゼーションのためのプローブまたはプライマーとして (Hyrup およびNielsen (1996) 前出；Perry-O'Keefe (1996) 前出) 使用され得る。

40

50

【0137】

別の実施形態において、46566のPNAは、PNAに対して脂肪親和性基または他のヘルパー基を付着することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、あるいはリポソームまたは当該分野で公知の薬物送達の他の技術の使用によって、(例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために)改変され得る。例えば、46566核酸分子のPNA-DNAキメラが生成され得、これは、PNAおよびDNAの有利な特性を合わせ得る。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)がDNA部分と相互作用することを可能にし、一方PNA部分は、高い結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の結合数、および方向の点におい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、および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結合化学および改変されたヌクレオシドアナログ(例えば、5'--(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホロアミダイト)を使用して固体支持体上で合成され得、PNAとDNAの5'末端との間として使用され得る(Mag, M.ら(1989)Nucleic Acids Res. 17:5973-88)。次いで、PNAモノマーは、段階的な様式で結合されて、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(Petersen, K. H.ら(1975)Bioorganic Med. Chem. Lett. 5:11119~11124)。

【0138】

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、ペプチドのような他の付属基(例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するため)、または細胞膜(例えば、Letsingerら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553~6556; Lemaitreら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648~652; PCT公開番号WO88/09810を参照のこと)もしくは血液脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと)を横切る輸送を容易にする薬剤を含み得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発(hybridization-triggered)切断剤(例えば、Krolら(1988)Biotechnology 6:958~976を参照のこと)または挿入剤(例えば、Zon(1988)Pharm. Res. 5:539~549)を用いて改変され得る。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誘発架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤)に結合体化され得る。

【0139】

(VI. 本発明の方法において使用される単離された46566タンパク質および抗46566抗体)

本発明の方法は、単離された46566タンパク質、およびその生物学的に活性な部分、ならびに抗46566抗体を惹起するための免疫原としての使用に適切なポリペプチドフラグメントの使用を含む。1つの実施形態において、ネイティブ46566タンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を使用する適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、46566タンパク質は、組換えDNA技術によって生成される。組換え発現に代えて、46566タンパク質または46566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。

【0140】

本明細書中で使用される場合、46566タンパク質の「生物学的に活性な部分」は、46566活性を有する46566タンパク質のフラグメントを含む。46566タンパク

質の生物学的に活性な部分は、4 6 5 6 6 タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）と実質的に同一か、またはこれに由来するアミノ酸配列を含有するペプチドを含み、このペプチドは、4 6 5 6 6 全長タンパク質よりも短いアミノ酸配列を含み、そして4 6 5 6 6 タンパク質の少なくとも一つの活性を示す。代表的に、生物学的に活性な部分は、4 6 5 6 6 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。4 6 5 6 6 タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、2 5、5 0、7 5、1 0 0、1 2 5、1 5 0、1 7 5、2 0 0、2 5 0、3 0 0 以上のアミノ酸長である、ポリペプチドを有し得る。4 6 5 6 6 タンパク質の生物学的に活性な部分は、4 6 5 6 6 活性を調節する因子を開発するための標的として使用され得る。

【0 1 4 1】

10

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4 6 5 6 6 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、4 6 5 6 6 タンパク質は、配列番号2と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し、なお、上記V節において詳細に記載したように、天然の対立遺伝子改変体または変異体に起因するアミノ酸配列と異なる。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4 6 5 6 6 タンパク質は、配列番号2に対して、少なくとも約5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 1 %、9 9 . 2 %、9 9 . 3 %、9 9 . 4 %、9 9 . 5 %、9 9 . 6 %、9 9 . 7 %、9 9 . 8 %、9 9 . 9 %以上同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。

20

【0 1 4 2】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性のパーセントを決定するため、これらの配列を最適な比較目的のために整列させる（例えば、最適な整列のために第1のアミノ酸および第2のアミノ酸の1つもしくは両方、または第1の核酸配列および第2の核酸配列の1つもしくは両方にギャップが導入され得、そして非同一の配列は、比較目的のためには無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的のために整列された参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも3 0 %、好ましくは少なくとも4 0 %、より好ましくは少なくとも5 0 %、さらにより好ましくは少なくとも6 0 %、およびさらにより好ましくは少なくとも7 0 %、8 0 %、または9 0 %である（例えば、2 4 4 個のアミノ酸残基を有する配列番号2の4 6 5 6 6 アミノ酸配列に対して第2配列を整列させる場合、少なくとも9 3 個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも1 2 4 個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも1 5 6 個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも1 8 7 個のアミノ酸残基、およびさらにより好ましくは少なくとも2 0 0 個、2 1 0 個、2 1 5 個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の配列位置が、第2の配列において対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占領される場合、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」と等価である）。2つの配列間の同一性のパーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数であり、2つの配列の最適な整列のために導入されることが必要であるギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。

30

【0 1 4 3】

40

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、G C G ソフトウェアパッケージ (h t t p : / / w w w . g c g . c o m から入手可能)においてG A P プログラムに組み込まれたN e e d l e m a n およびW u n s c h (J . M o l . B i o l . 4 8 : 4 4 4 - 4 5 3 (1 9 7 0))のアルゴリズムを用い、B l o s u m 6 2 マトリクスまたはP A M 2 5 0 マトリクスのいずれか、ならびにギャップウェイト1 6、1 4、1 2、1 0、8、6、または4およびレンジスウェイト (l e n g t h w e i g h t) 1、2、3、4、5、または6を用いて決定される。さらに別の

50

好ましい実施形態において、2つのスクレオチド配列間のパーセント同一性は、G C G ソフトウェアパッケージ (h t t p : / / w w w . g c g . c o m から入手可能) の G A P プログラムを用い、N W S g a p d n a . C M P 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 およびレンジスウェイト 1、2、3、4、5、または 6 を用いて決定される。別の実施形態において、2種のアミノ酸またはスクレオチド配列間のパーセント同一性が、A L I G N プログラム (バージョン 2.0 または 2.0 U) に組み込まれた E. M e y e r および W. M i l l e r (C o m p u t . A p p l . B i o s c i . 4 : 1 1 - 1 7 (1988)) のアルゴリズムを用い、P A M 1 2 0 ウェイト残基表、ギャップレンジスペナルティー 12 およびギャップペナルティー 4 を用いて決定される。

10

【0144】

本発明の方法はまた、4 6 5 6 6 キメラタンパク質または 4 6 5 6 6 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、4 6 5 6 6 「キメラタンパク質」または 4 6 5 6 6 「融合タンパク質」は、非 4 6 5 6 6 ポリペプチドに作動可能に連結された 4 6 5 6 6 ポリペプチドを含む。「4 6 5 6 6 ポリペプチド」は、4 6 5 6 6 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、「非 4 6 5 6 6 ポリペプチド」は、4 6 5 6 6 タンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質 (例えば、4 6 5 6 6 タンパク質とは異なり、かつ同一または異なる生物体に由来するタンパク質) に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。4 6 5 6 6 融合タンパク質において、4 6 5 6 6 ポリペプチドは、4 6 5 6 6 タンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。好ましい実施形態において、4 6 5 6 6 融合タンパク質は、4 6 5 6 6 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、4 6 5 6 6 融合タンパク質は、4 6 5 6 6 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「作動可能に連結された」は、4 6 5 6 6 ポリペプチドおよび非 4 6 5 6 6 ポリペプチドが、互いにインフレームで融合されていることを示すことが意図される。非 4 6 5 6 6 ポリペプチドは、4 6 5 6 6 ポリペプチドの N 末端または C 末端に融合され得る。

20

【0145】

例えば、1つの実施形態において、融合タンパク質は、G S T - 4 6 5 6 6 融合タンパク質であり、ここで 4 6 5 6 6 配列は、G S T 配列の C 末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換え 4 6 5 6 6 タンパク質の精製を容易にし得る。別の実施形態において、この融合タンパク質は、その N 末端で異種シグナル配列を含む 4 6 5 6 6 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、4 6 5 6 6 の発現および / または分泌は、異種シグナル配列の使用を通じて増加され得る。

30

【0146】

本発明の方法において使用される 4 6 5 6 6 融合タンパク質は、薬学的組成物に組み込まれ、インビオで被験体に投与され得る。4 6 5 6 6 融合タンパク質は、4 6 5 6 6 基質のバイオアベイラビリティーに影響するように使用され得る。4 6 5 6 6 融合タンパク質の使用は、例えば、(i) 4 6 5 6 6 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) 4 6 5 6 6 タンパク質遺伝子の誤った調節；および(iii) 4 6 5 6 6 タンパク質の異常な翻訳後修飾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。

40

【0147】

さらに、本発明の方法において使用される 4 6 5 6 6 融合タンパク質は、被験体において抗 4 6 5 6 6 抗体を産生するための免疫原として、4 6 5 6 6 リガンドを精製するため、およびスクリーニングアッセイにおいて、4 6 5 6 6 と 4 6 5 6 6 基質の相互作用を阻害する分子を同定するために使用され得る。

【0148】

好ましくは、本発明の方法において使用される 4 6 5 6 6 キメラタンパク質または 4 6 5 6 6 融合タンパク質は、標準的組換え D N A 技術により生成される。例えば、異なるポリ

50

ペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技術に従って（例えば、連結のために平滑末端または付着末端(staggered-end)を使用すること、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合は付着末端(cohesive end)を埋めること(filling-in)、望ましくない結合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結によって）インフレームとともに連結される。別の実施形態において、融合遺伝子は、自動化DNA合成機を含む従来の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、2つの連続する遺伝子フラグメント間の相補的オーバーハング(overhang)を生じるアンカープライマーを使用して実施され得、これらは、引き続いてキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールされ、そして再増幅され得る（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）をコードする、多くの発現ベクターが、市販されている。46566をコードする核酸は、このような発現ベクターへクローニングされ得、その結果、融合部分は、インフレームで46566タンパク質に連結される。

【0149】

本発明はまた、46566タンパク質の改変体の使用に関し、この46566タンパク質の改変体は、46566アゴニスト（模倣物）または46566アンタゴニストのいずれかとして機能する。46566タンパク質の改変体を、変異誘発（例えば、46566タンパク質の個別の点変異または短縮化(truncation)）により作製し得る。46566タンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態の46566タンパク質の生物学的活性と実質的に同一な活性か、またはそのサブセットを保持し得る。46566タンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態の46566タンパク質の1つ以上の活性を、例えば、この46566タンパク質の46566媒介活性を競合的に調節することによって阻害し得る。従って、特定の生物学的効果を、制限された機能の改変体で処理することにより誘発し得る。1つの実施形態において、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有する改変体での被験体の処置は、天然に存在する形態の46566タンパク質での処置と比較して、被験体においてより少ない副作用を有する。

【0150】

1つの実施形態において、46566アゴニスト（模倣物）または46566アンタゴニストのいずれかとして機能する46566タンパク質の改変体は、46566タンパク質アゴニスト活性または46566タンパク質アンタゴニスト活性について、46566タンパク質の変異体（例えば、短縮型変異体）のコンビナトリアルライブラリーを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、46566改変体の多様なライブラリーは、核酸レベルにおける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。46566改変体の多様なライブラリーは、例えば、遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的に連結することによって産生され得、その結果、潜在的な46566配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、または代替的に、そこに46566配列のセットを含む、より大きな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のために）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46566改変体のライブラリーを産生するために使用し得る種々の方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成は、自動化DNA合成機において実行され、次いで合成遺伝子は、適切な発現ベクターに連結され得る。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的な46566配列の所望のセットをコードする配列のすべての提供を可能にする。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) Ann. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら(1984) Science 198:1056; Ikeら(1983) Nucleic Acid Res. 11:477を参照

10

20

30

40

50

のこと)。

【0151】

さらに、46566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、46566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46566フラグメントの多様な集団を生成するために使用され得る。1つの実施形態において、コード配列フラグメントのライブラリーは、46566コード配列の二本鎖PCRフラグメントを、ニックが1分子あたり約1つだけ生じる条件下でヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、DNAを再生させて、異なるニックを有する生成物からセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成すること、S1ヌクレアーゼを用いる処理によって、再形成された二重鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクターに連結すること、によって生成され得る。この方法によって、46566タンパク質のN末端、C末端および種々のサイズの内部フラグメントをコードする発現ライブラリーを誘導し得る。

【0152】

点変異または短縮化によって作製される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、および選択された特性を有する遺伝子産物について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、46566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る遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングのために適合可能である。高スループット分析に従う、大きい遺伝子ライブラリーのスクリーニングのための最も広範に使用される技術は、代表的には、複製可能な発現ベクターへの遺伝子ライブラリーのクローニング、得られるベクターのライブラリーでの適切な細胞の形質転換、および所望の活性の検出が、遺伝子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条件下でのコンビナトリアル遺伝子の発現を含む。帰納的アンサンブル変異誘発(recursive ensemble mutagenesis)(REM)は、ライブラリーにおける機能的変異体の頻度を高める新たな技術であり、46566改変体を同定するためにスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る(ArkkinおよびYouvan(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave(1993)Prot. Eng. 6(3):327-331)。

【0153】

本発明の方法は、抗46566抗体の使用をさらに包含する。単離された46566タンパク質、またはその一部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を使用して、46566を結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。全長46566タンパク質が使用され得るか、または代替的に、46566の抗原性ペプチドフラグメントは、免疫原として使用され得る。46566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46566のエピトープを含み、その結果、そのペプチドに対して惹起された抗体は、46566タンパク質との特異的な免疫複合体を形成する。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、なにより好ましくは、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。

【0154】

その抗原性ペプチドによって含まれる好ましいエピトープは、そのタンパク質の表面に位置する46566の領域(例えば、親水性領域)ならびに高い抗原性を有する領域である。

【0155】

代表的には、46566免疫原を使用して、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)に免疫原を用いて免疫することにより抗体を調製する。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現された46566タンパク質または化学合成された46566ポリペプチドを含み得る。この調製物は、アジュvant(例えば、フロイント

10

20

30

40

50

完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバント、または同様な免疫刺激剤)をさらに含み得る。適切な被験体を免疫原性46566調製物で免疫することにより、ポリクローナル抗46566抗体応答が惹起される。

【0156】

用語「抗体」とは、本明細書中で用いられる場合、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な一部(すなわち、抗原を特異的に結合する(抗原と免疫反応する)抗原結合部位を含む分子(例えば、46566))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、酵素(例えば、ペプシン)で抗体を処理することにより生成され得る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、46566分子を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。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」とは、本明細書中で使用される場合、46566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、代表的には、これが免疫反応する特定の46566タンパク質に対する単一の結合親和性を提示する。

【0157】

ポリクローナル抗46566抗体は、適切な被験体に46566免疫原を用いて免疫することにより、上記のように調製され得る。免疫した被験体における抗46566抗体力価は、標準的技術により(例えば、固定化した46566を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を用いて)経時的にモニターされ得る。所望であれば、46566に対する抗体分子は、哺乳動物から(例えば、血液から)単離され得、そしてさらに周知の技術(例えば、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィー)により精製され得る。免疫後、適切な時間に、例えば、抗46566抗体の力価が最も高いときに、抗体生成細胞を被験体から獲得し得、そしてこれを使用して、標準的技術(例えば、初めは、KohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495-497により記載されたハイブリドーマ技術(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 73:2927-31; およびYehら(1982)Int. J. Cancer 29:269-75もまた参考のこと)、より最近のヒト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., 77-96頁)またはトリオーマ(trioma)技術)によりモノクローナル抗体を調製し得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマを生成する技術は、周知である(一般には、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; Gefter, M. L.ら(1977)Somat. Cell Genet. 3:231-36を参考のこと)。簡潔には、不死化細胞株(代表的には骨髄腫細胞)を、上記のように46566免疫原で免疫した哺乳動物由来のリンパ球(代表的には、脾臓細胞)と融合し、そして得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、46566を結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを同定する。

【0158】

リンパ球と不死化細胞株とを融合するために使用される任意の多くの周知のプロトコルは、抗46566モノクローナル抗体を生成する目的で適用され得る(例えば、Galefら(1977)Nature 266:55052; Gefterら(1977)上記; Lerner(1981)上記; およびKenneth(1980)、上記を参考のこと)。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が存在し、これらは、

10

20

30

40

50

やはり有用であることを理解する。代表的には、不死化細胞株（例えば、骨髓腫細胞株）はリンパ球と同じ哺乳動物種に由来する。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を用いて免疫したマウス由来のリンパ球と不死化マウス細胞株とを融合することにより作製され得る。好ましい不死化細胞株は、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養培地（「HAT培地」に感受性であるマウス骨髓腫細胞株である。任意の多くの骨髓腫細胞株は、標準的技術に従う融合パートナーとして使用され得る（例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/O-Ag14骨髓腫株）。これらの骨髓腫株は、ATCCから入手可能である。代表的には、HAT感受性マウス骨髓腫細胞を、ポリエチレンギリコール（「PEG」）を使用してマウス脾臓細胞に融合する。次いで、融合から得られたハイブリドーマ細胞を、HAT培地を用いて選択する（このことにより、融合していない細胞および生成性でない融合骨髓腫細胞は死ぬ（融合していない脾臓細胞は、形質転換していないので数日後に死ぬ））。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、46566を結合する抗体について、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより（例えば、標準的ELISAアッセイを使用して）検出される。

10

20

30

40

【0159】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するかわりに、モノクローナル抗46566抗体を、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46566を用いてスクリーニングすることにより同定および単離し得、それによって46566を結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離し得る。ファージディスプレイライブラリーを生成し、そして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を生成し、そしてスクリーニングする際の使用に特になじみやすい方法および試薬の例は、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号；Kangら、PCT国際公開WO92/18619；Dowerら、PCT国際公開WO91/17271；Winterら、PCT国際公開WO92/20791；Marklandら、PCT国際公開WO92/15679；Breitlingら、PCT国際公開WO93/01288；MacCaffertyら、PCT国際公開WO92/01047；Garrardら、PCT国際公開WO92/09690；Ladnerら、PCT国際公開WO90/02809；Fuchsら（1991）Bio/Technology 9:1370-1372；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；Clarkson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 Acids Res. 19:4133-4137；Barbasら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982；およびMacCaffertyら（1990）Nature 348:552-554に見出され得る。

30

40

50

【0160】

さらに、ヒトおよび非ヒト部分の両方を含む組換え抗46566抗体（例えば、キメラおよびヒト化モノクローナル抗体）は、本発明の技術範囲内であり、これは、標準的な組換えDNA技術を用いて作製され得る。このようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術により（例えば、Robinsonら、国際出願番号PCT/US86/02269；Akiraら、欧州特許出願第184,187号；

T a n i g u c h i , M . , 欧州特許出願第 1 7 1 , 4 9 6 号 ; M o r r i s o n ら 欧州特許出願第 1 7 3 , 4 9 4 号 ; N e u b e r g e r ら、P C T 国際公開 W O 8 6 / 0 1 5 3 3 ; C a b i l l y ら、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号 ; C a b i l l y ら、欧州特許出願番号第 1 2 5 , 0 2 3 号 ; B e t t e r ら (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 ; L i u ら (1 9 8 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 3 4 3 9 - 3 4 4 3 ; L i u ら (1 9 8 7) J . I m m u n o l . 1 3 9 : 3 5 2 1 - 3 5 2 6 ; S u n ら (1 9 8 7) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 4 : 2 1 4 - 2 1 8 ; N i s h i m u r a ら (1 9 8 7) C a n c e r R e s . 4 7 : 9 9 9 - 1 0 0 5 ; W o o d ら (1 9 8 5) N a t u r e 3 1 4 : 4 4 6 - 4 4 9 ; S h a w ら (1 9 8 8) J . N a t l . C a n c e r I n s t . 8 0 : 1 5 1 0 5 3 - 1 5 5 9 ; M o r r i s o n , S . L . (1 9 8 5) S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2 - 1 2 0 7 ; O i ら (1 9 8 6) B i o T e c h n i q u e s 4 : 2 1 4 ; W i n t e r 米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ; J o n e s ら (1 9 8 6) N a t u r e 3 2 1 : 5 5 2 - 5 2 5 ; V e r h o e y e n ら (1 9 8 8) S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 ; および B e i d l e r ら (1 9 8 8) J . I m m u n o l . 1 4 1 : 4 0 5 3 - 4 0 6 0 に記載される方法を使用して) 生成され得る。

【 0 1 6 1 】

抗 4 6 5 6 6 抗体は、4 6 5 6 6 タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、(例えは、細胞溶解物または細胞上清において) 4 6 5 6 6 タンパク質を検出するため 20 に使用され得る。抗 4 6 5 6 6 抗体は、例えは、所定の処置レジメの効力を決定するため、臨床試験の手順の一部として、組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするため 30 に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と結合させる(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、および放射活性物質が挙げられる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、- ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ ; 適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン / ピオチンおよびアビジン / ピオチンが挙げられ ; 適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン (u m b e l l i f e r o n e) 、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、ダンシルクロライド、またはフィコエリトリンが挙げられ ; 発光物質の例には、ルミノールが挙げられ ; 生体発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ ; そして、適切な放射活性物質の例には、^{1 2 5} I 、^{1 3 1} I 、^{3 5} S 、または³ H が挙げられる。

【 0 1 6 2 】

(V I I . 電子装置読み取り可能媒体およびアレイ)

本発明の 4 6 5 6 6 調節因子を含む電子装置読み取り可能媒体もまた提供される。本明細書中で使用される場合、「電子装置読み取り可能媒体」とは、電子装置によって直接読み取られ得、かつアクセスされ得るデータまたは情報を保存、保持または収容する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：磁気的記憶媒体(例えは、フロッピー(登録商標)ディスク、ハードディスク記憶媒体および磁気テープ)；光学的記憶媒体(例えは、コンパクトディスク)；電気的記憶媒体(例えは、R A M 、R O M 、E P R O M 、E E P R O M など)；一般的なハードディスクおよびこれらのカテゴリーのハイブリッド(磁気的 / 光学的記憶媒体など)。この媒体は、本発明のマーカーをそこに記録しているように適応または構成される。

【 0 1 6 3 】

本明細書中で使用される場合、用語「電子装置」は、データまたは情報を保存するように構成または適応された、任意の適切な計算装置もしくは処理装置または他のデバイスを含むように意図される。本発明とともに使用するのに適した電子装置の例としては、以下が挙げられる：独立型の計算装置；ネットワーク(ローカルエリアネットワーク (L A N) 、広域ネットワーク (W A N) インターネット、インターネットおよびエクストラネット 50

(Extranet)を含む) ; 電子的電気器具(例えば、携帯情報端末機器(PDA)、携帯電話、ページャーなど) ; 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。

【0164】

本明細書中で使用される場合、「記録される」とは、電子装置読み取り可能媒体上に情報を記憶またはコード化するプロセスをいう。当業者は、公知の媒体上に情報を記録するための任意の現在公知の方法を容易に採用して、本発明の46566調節因子を含む製品を作製し得る。

【0165】

種々のソフトウェアプログラムおよびフォーマットが、本発明のマーカー情報を電子装置読み取り可能媒体上に記憶するために使用され得る。例えば、46566節因子に対応する核酸配列は、市販されるソフトウェア(Word PerfectおよびMicrosoft Wordなど)にフォーマットされて、ワードプロセシングテキストファイルで表示され得るか、またはASCIIファイル(データベースアプリケーション(DB2、Sybase、Oracleなど)において記憶される)の形式ならびに他の形式で表示される。本発明の46566調節因子が記録された媒体を獲得または作製するために、多くのデータプロセッサー構造化フォーマット(例えば、テキストファイルまたはデータベース)を使用し得る。

【0166】

本発明の46566調節因子を読み取り可能形態で提供することによって、種々の目的のために、ルーチンにマーカー配列情報へアクセスし得る。例えば、当業者は、読み取り可能形態の本発明のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を使用して、標的配列または標的構造モチーフを、そのデータ記憶手段中に記憶された配列情報と比較し得る。検索手段を使用して、特定の標的配列または標的モチーフに一致する、本発明の配列のフラグメントまたは領域を同定する。

【0167】

従って、本発明は、被験体が疼痛障害、または疼痛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を保持するための媒体を提供し、ここで、この方法は、46566調節因子の存在または非存在を決定する工程、および46566調節因子の存在または非存在に基づいて、被験体が疼痛障害、または疼痛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/あるいはこの疼痛障害、または疼痛障害前状態に対する、特定の処置を推奨する工程、を包含する。

【0168】

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46566調節因子に関連する疼痛障害、またはこの疼痛障害に対する素因を有するか否かを決定するための方法を提供し、ここで、この方法は、46566調節因子の存在または非存在を決定する工程、および46566調節因子の存在または非存在に基づいて、被験体が疼痛障害、またはこの疼痛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/あるいはこの疼痛障害、または疼痛障害前状態に対する、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、被験体に関する表現型情報を受け取る工程、および/または被験体に関する表現型情報をネットワークから得る工程を包含する。

【0169】

本発明はまた、被験体が46566調節因子に関連する疼痛障害、またはこの疼痛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、ネットワークの中で提供し、この方法は、46566調節因子と関連する情報を受ける工程、この被験体に関する表現型情報を受ける工程、46566調節因子および/または疼痛障害に対応する情報をネットワークから入手する工程、そして、表現型情報、46566調節因子、および入手された情報のうちの1つ以上に基いて、この被験体が疼痛障害、または疼痛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。この方法はさらに、疼痛障害、または疼痛障害前状態に対する特定の処置を推奨する工程を包含し得る。

10

20

30

40

50

【0170】

本発明はまた、被験体が疼痛障害、または疼痛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、46566調節因子に関する情報を受ける工程、被験体に関する表現型情報を受ける工程、46566調節因子および/または疼痛障害に対する情報をネットワークから入手する工程、そして表現型情報、46566調節因子および入手した情報のうちの1つ以上に基いて、この被験体が疼痛障害、または疼痛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。この方法はさらに、疼痛障害、または疼痛障害前状態に対する特定の処置を推奨する工程を包含し得る。

【0171】

本発明はまた、本発明の46566調節因子を含むアレイを包含する。このアレイは、アレイ中の1つ以上の遺伝子の発現をアッセイするために使用され得る。1つの実施形態において、アレイは、このアレイ中の遺伝子の組織特異性を確認するために、組織における遺伝子発現をアッセイするために使用され得る。この様式において、約7600個までの遺伝子が、発現について同時にアッセイされ得る。これによって、1つ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ィールが開発され得る。

【0172】

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、組織中の遺伝子の組の発現レベルもまた、確認可能である。従って、遺伝子は、その組織発現自体に基づいて、そしてその組織中の発現レベルに基づいて分類され得る。このことは、例えば、組織間の遺伝子発現の関係を確認することにおいて有用である。従って、1つの組織が混乱され得、そして第二の組織における遺伝子発現に対するその影響が、決定され得る。この文脈において、生物学的刺激に応答した、別の細胞型に対する1つの細胞型の影響が、決定され得る。このような決定は、例えば、遺伝子発現レベルでの細胞-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所望でない影響を有する場合、本発明は、所望で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、相殺薬剤を同時投与するか、さもなければ所望でない効果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も、所望でない生物学的影響が分子レベルで決定され得る。従って、標的遺伝子以外の遺伝子の発現に対する薬剤の影響が確認され、そして相殺され得る。

【0173】

別の実施形態において、アレイが、そのアレイ中の1つ以上の遺伝子の発現のタイムコースをモニタリングするために使用され得る。このことは、本明細書中に開示されるような種々の生物学的文脈（例えば、疼痛障害の発症、疼痛障害の進行、および疼痛障害に関連するプロセス）において生じ得る。

【0174】

このアレイはまた、同じ細胞または異なる細胞中の他の遺伝子の発現に対する、ある遺伝子の発現の影響を確認するためにも有用である。このことは、例えば、最終的な標的も下流の標的も調節され得ない場合に、治療的介入についての代替的分子標的の選択を提供する。

【0175】

このアレイはまた、正常細胞および異常細胞中の1つ以上の遺伝子の差示的発現パターンを確認するためにも有用である。このことは、診断的介入または治療的介入についての分子標的として作用し得る遺伝子の組を提供する。

【0176】

本発明は、限定として解釈されるべきではない以下の実施例によって、さらに例示される。本明細書を通じて引用される全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容、ならびに図面および配列表は、本明細書中で参考として援用される。

【実施例】

【0177】

10

20

30

40

50

(実施例 1 : ヒト組織における 46566 発現)

(材料および方法)

ヒト 46566 の発現の分析について、以下の方法を使用した。

【0178】

組織を、種々のヒト組織から収集した。総 RNA を、トリゾール法を用いて調製し、そして DNAse で処理して、混入しているゲノム DNA を除去した。cDNA を、標準的な技術を使用して合成した。逆転写酵素の非存在下でのモック cDNA 合成は、コントロール 18S RNA 遺伝子の PCR 増幅が検出不能であるサンプルを生じ、これによりゲノム DNA 混入物の有効な除去を確認した。46566 発現を、TaqMan (登録商標) 定量的 PCR 分析を、製造業者 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) の指示に従って実施して測定した。 10

【0179】

PCR プローブを、ヒト 46566 の配列 (配列番号 1) に基づいて、Primer Express ソフトウェア (PE Biosystems) によって設計した。

【0180】

異なる組織間の結果を標準化するために、異なる蛍光標識によって識別可能な 2 つのプローブを、各サンプルに添加した。従って、46566 遺伝子についてのプローブおよび内部コントロールとしての 18S RNA についてのプローブの差示的標識は、同じウェル中での同時測定を可能にした。順方向プライマーおよび逆方向プライマーならびに 18S RNA およびヒトまたはマウス 46566 の両方についてのプローブを、TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems) に添加した。プライマーおよびプローブの最終濃度は変動し得るが、各々は、所定の実験内で内部で一貫した。代表的な実験は、順方向および逆方向のプライマー 200 nM + 18S RNA についてのプローブ 100 nM、ならびに順方向および逆方向のプライマー各々 4500 nM + マウス NCE - SLC24A についてのプローブ 150 nM を含んだ。TaqMan マトリックス実験を、ABI PRISM 770 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) を使用して実施した。サーマルサイクラー条件は、以下の通りであった：50 度 2 分間、および 95 度 10 分間の維持、その後、(95 度 15 秒間、続いて 30 60 度 1 分間) × 40 サイクルの、2 段階 PCR。 20

【0181】

以下の方法を、同じ組織中の 18S RNA 発現と比較して、組織サンプル中のヒト 46566 遺伝子発現を定量的に計算するために使用した。PCR 増幅が開始された閾値を、製造業者のソフトウェアを使用して決定した。閾値での PCR サイクル数を、CT と称した。相対的発現を、以下のように計算した：

2 - ((CT test - CT 18S) 目的の組織 - ((CT test - CT 18S) パネル中最も低い発現の組織))

サンプルを、二連で行い、そして 2 つの相対的発現決定の平均を示す。全てのプローブを、高い発現レベルを有する組織からの RNA の連続希釈に対して試験し、そして内部コントロール 18S についての傾きと類似の傾きを有するテンプレート cDNA の量に対して線形であった相対発現レベルを示したプローブだけを、使用した。 40

【0182】

(結果)

46566 は、神経組織で最も高度に発現された。最高レベルの 46566 発現は、脳において見られ、脊髄および脊髄神経節 (DRG) がそれに続いた。上述の TaqMan データを確認するために、インサイチュハイブリダイゼーションを、ヒトプローブを使用して実施した。

【0183】

上記の結果は、46566 が相対的に脳特異的遺伝子であることを証明している。

【0184】

(実施例 2 : 疼痛についての動物モデル由来のラット組織における 4 6 5 6 6 発現)
(材料および方法)

ラット 4 6 5 6 6 発現の分析のために、実施例 1 の方法を使用した。

(結果)

種々のラット組織を用いた T a q M a n 分析により、4 6 5 6 6 が、ヒト対応物と同様に、神経組織において発現することが実証され、(実施例 1 で述べられている) ヒトのパネルと同様の発現パターンを示した。

【0 1 8 5】

疼痛 / 炎症についての動物モデルにおける 4 6 5 6 6 発現もまた決定した。使われたモデルの一つは、神経結紮モデル (C C I) であり、ここで、動物の坐骨神経の慢性的な緩い絞窄が、神経障害性の疼痛を誘導する。神経の損傷は、神經過敏と長期的な始原求心性侵害受容器閾値の低下 (痛覚過敏) という結果をもたらした。さらに、軸索損傷の後、機械的異痛症および熱異痛症が発症した。動物に基づく使用された別の実例は、完全フロイントアジュバント (C F A) モデルであり、ここで、げっ歯類前肢もしくはサル膝関節への C F A 注射が、有害な刺激に対する閾値の低下 (痛覚過敏) および無害な刺激に対する閾値の低下 (異痛症) として表れる、変更された疼痛応答の発生と共に、炎症反応を誘導する。

【0 1 8 6】

これらの実験の結果は、C C I 動物の脊髄における 4 6 5 6 6 の調節が存在せず、そして C F A により誘導される炎症性疼痛モデルにおいていくらかの下方調節があることを示している。より明白な 4 6 5 6 6 の下方調節は、軸策切断後に動物において観察された。

【0 1 8 7】

(等価物)

当業者は、慣用的実験に過ぎない実験を使用して、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、添付の特許請求の範囲によって包含されると意図される。

【図面の簡単な説明】

【0 1 8 8】

【図 1 A - 1】図 1 A ~ 1 B は 4 6 5 6 6 の c D N A 配列 (配列番号 1) とアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

【図 1 A - 2】図 1 A ~ 1 B は 4 6 5 6 6 の c D N A 配列 (配列番号 1) とアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

【図 1 B】図 1 A ~ 1 B は 4 6 5 6 6 の c D N A 配列 (配列番号 1) とアミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。

【図 2】図 2 は 4 6 5 6 6 ポリペプチドの疎水性解析を示す。

10

20

30

【 図 1 A - 1 】

【図1A-2】

FIGURE 1A (続き)

【 図 1 B 】

FIGURE 1B

FIGURE 1A

【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 03/037254 A2(51) International Patent Classification⁵: A61K(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CII, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, IC, IE (utility model), IE, IS, I¹ (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KB, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, SI, TM, TN, TR, TI, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(30) Priority Data:
60/335,078 31 October 2001 (31.10.2001) US

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SILOS-SANTIAGO, Inmaculada [ES/US]; 180 Moss Hill Road, Jamaica Plain, MA 02130 (US).

(74) Agent: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.; Legal-Intellectual Property (OBW-16), 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

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

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



A2

WO 03/037254

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF PAIN DISORDERS USING 46566

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the treatment and diagnosis of pain disorders, including, but not limited to, inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a pain disorder or modulating pain and/or inflammation response. The invention further provides a method for modulating pain and/or inflammation in a subject. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a pain disorder characterized by aberrant 46566 polypeptide activity or aberrant 46566 nucleic acid expression.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

**METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND
DIAGNOSIS OF PAIN DISORDERS USING 46566**

This application claims priority to U.S. provisional application number 60/335,078, 5 filed October 31, 2001, the contents of which are herein incorporated by reference.

Pain is initiated when the peripheral terminals of a subgroup of sensory neurons are activated by noxious chemical, mechanical or thermal stimuli. These neurons, called nociceptors, transmit information regarding tissue damage to pain-processing centers in the spinal cord and brain (Fields, H.L. *Pain*, McGraw-Hill, New York, 1987).

Once a nociceptor is activated, a chain of events occur that transmit this sensation to the brain to be perceived as pain. An important step in this process is the generation of an action potential in a neuron. An action potential results in the accumulation of calcium ions in the axon terminal. This accumulation of calcium causes a release of neurotransmitter into the synapse and the propagation, ultimately, of the information 10 regarding pain to the next neuron in the pathway from the nociceptor to the brain.

Calcium homeostasis in neurons is vital for proper control of impulses. When 15 action potentials reach the terminal end of an axon, calcium enters the cell at a rate much faster than it can be removed. This causes the release of neurotransmitter into the synapse. In order to regulate this pathway it is vital that the cell have a mechanism to control the 20 intracellular concentration of calcium ions.

The K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers are transporters of the plasma membrane of most cell types. This Na⁺/Ca²⁺ exchanging activity is particularly important to 25 excitable cells in general and neurons in particular. In these cells, K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchangers have a crucial role in the control of the Ca²⁺ homeostasis in environments where the Na⁺ gradient and/or the membrane potential are lower than normal.

Given the prevalence of pain disorders, and the lack of effective cures and early 30 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 treatment of pain disorders. The present invention is based, at least in part, on the discovery that 46566 (Na-Ca exchanger SLC8) is predominantly expressed in nervous 35 tissues (the brain, spinal cord, and dorsal root ganglia (DRG)). The present invention is

WO 03/037254

PCT/US02/34567

also based, at least in part, on the discovery that the 46566 gene is down-regulated in the spinal cord of animal models for pain, known as complete Freund's adjuvant (CFA) and axotomy models. In the CFA model, CFA is injected in the rodent paw or the monkey knee joint, thereby inducing an inflammatory response with the development of altered

- 5 pain responses manifested as reduced threshold to noxious stimuli (hyperalgesia) and lowered thresholds to innocuous stimuli (allodynia). The axotomy model involves severing the sciatic nerve of an animal, thereby inducing neuropathic pain.

In one aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of treating a pain disorder, *e.g.*, inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain.

- 10 The method includes assaying the ability of the compound to modulate 46566 nucleic acid expression or 46566 polypeptide activity. In one embodiment, the ability of the compound to modulate nucleic acid expression or 46566 polypeptide activity is determined by detecting modulation of Na-Ca activity in a cell or by detecting intracellular calcium levels.

In another aspect, the invention provides methods for identifying a compound capable of modulating pain and/or inflammation. The method includes contacting a cell expressing a 46566 nucleic acid or polypeptide, *e.g.*, a neuron, with a test compound and assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 46566 nucleic acid or the activity of a 46566 polypeptide.

In a further aspect, the invention features a method for modulating a pain signaling mechanism in a cell. The method includes contacting a cell, *e.g.*, a neuron, with an effective amount of 46566 modulator, for example, an anti-46566 antibody, a 46566 polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, a 46566 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring

- 25 allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, a small molecule, an antisense 46566 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof, or a ribozyme.

In yet another aspect, the invention features a method for treating a subject having a pain disorder, *e.g.*, a pain disorder characterized by aberrant 46566 polypeptide activity or 30 aberrant 46566 nucleic acid expression. The method includes administering to the subject a therapeutically effective amount of a 46566 modulator, *e.g.*, in a pharmaceutically acceptable formulation or by using a gene therapy vector. In one embodiment, the 46566 modulator may be a small molecule, an anti-46566 antibody, a 46566 polypeptide

WO 03/037254

PCT/US02/34567

comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof, a 46566 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 90 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an isolated naturally occurring allelic variant of a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, an antisense 46566 5 nucleic acid molecule, a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof, or a ribozyme.

In one embodiment, the pain disorder is inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following 10 detailed description and claims.

Figures 1A-1B depict the cDNA sequence (SEQ ID NO:1) and amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of 46566.

Figure 2 depicts a hydrophobicity analysis of the 46566 polypeptide.

The present invention provides methods and compositions for the diagnosis and 15 treatment of pain disorders. The present invention is based, at least in part, on the discovery that 46566 is predominantly expressed in nervous tissues (the brain, spinal cord, and dorsal root ganglia (DRG)). The present invention is also based, at least in part, on the discovery that the 46566 gene is down-regulated in the spinal cord of animal models for pain, known as complete Freund's adjuvant (CFA) and axotomy models. In the CFA 20 model, CFA is injected in the rodent paw or the monkey knee joint, thereby inducing an inflammatory response with the development of altered pain responses manifested as reduced threshold to noxious stimuli (hyperalgesia) and lowered thresholds to innocuous stimuli (allodynia). The axotomy model involves severing the sciatic nerve of an animal, thereby inducing neuropathic pain.

25 Without intending to be limited by theory, it is believed that the 46566 molecule may be critical for regulating the physiology of neurons involved in nociceptive pathways. Evidence demonstrating that 46566 is downregulated in the spinal cord in the inflammatory model of pain and after nerve injury suggests a significant role of this exchanger in pain signaling mechanisms. Thus, the 46566 molecules, by participating in 30 pain signaling mechanisms, can modulate pain elicitation and provide diagnostic targets and therapeutic agents to control pain and treat pain disorders.

As used herein, the term "pain signaling mechanisms" includes the cellular mechanisms involved in the development and regulation of pain, *e.g.*, pain elicited by

WO 03/037254

PCT/US02/34567

noxious chemical, mechanical, or thermal stimuli, in a subject, *e.g.*, a mammal such as a human. In mammals, the initial detection of noxious chemical, mechanical, or thermal stimuli, a process referred to as "nociception", occurs predominantly at the peripheral terminals of specialized, small diameter primary afferent neurons, called polymodal nociceptors. These afferent neurons transmit the information to the central nervous system, evoking a perception of pain or discomfort and initiating appropriate protective reflexes.

As used herein, the term "pain disorder" includes a disease, and disorder or condition associated with or caused by pain. Examples of pain disorders include, arthritis, 10 allodynia, atypical trigeminal neuralgia, trigeminal neuralgia, somatoform disorder, hypoesthesia, hypocalgesia, neuralgia, heuritis, neurogenic pain, analgesia, anesthesia dolorosa, causalgia, sciatic nerve pain disorder, degenerative joint disorder, fibromyalgia, visceral disease, chronic pain disorders, migraine/headache pain, chronic fatigue syndrome, complex regional pain syndrome, neurodystrophy, plantar fasciitis or pain associated with 15 cancer.

The term pain disorder, as used herein, also includes conditions or disorders which are secondary to disorders such as chronic pain and/or neuropathic pain, *i.e.*, are influenced or caused by a disorder such as chronic pain and/or neuropathic pain. Examples of such conditions include, vasodilation and hypotension; conditions which are behavioral, *e.g.*, 20 alcohol dependence (see, *e.g.*, Hungund and Basavarajappa, (2000) *Alcohol and Alcoholism* 35:126-133); or conditions in which detrimental effect(s) are the result of separate disorders or injuries, *e.g.*, multiple sclerosis or spinal cord injury.

As used herein, the term "pain" is art recognized and includes a bodily sensation elicited by noxious chemical, mechanical, or thermal stimuli, in a subject, *e.g.*, a mammal 25 such as a human. Pain is initiated when the peripheral terminals of a subgroup of sensory neurons are activated by noxious chemical, mechanical or thermal stimuli. These neurons, called nociceptors, transmit information regarding tissue damage to pain-processing centres in the spinal chord and brain (Fields, H.L. *Pain*, McGraw-Hill, New York, 1987). The term "pain" includes chronic pain, such as lower back pain; pain due to arthritis, *e.g.*, 30 osteoarthritis; joint pain, *e.g.*, knee pain or carpal tunnel syndrome; myofascial pain, and neuropathic pain. The term "pain" further includes acute pain, such as pain associated with muscle strains and sprains; tooth pain; headaches; pain associated with surgery; or pain associated with various forms of tissue injury, *e.g.*, inflammation, infection, and ischemia.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

As used interchangeably herein, the terms "46566 activity," "biological activity of 46566" or "functional activity of 46566," include an activity exerted by a 46566 protein, polypeptide or nucleic acid molecule on a 46566 responsive cell or tissue or on a 46566 protein substrate, as determined *in vivo*, or *in vitro*, according to standard techniques.

- 5 46566 activity can be a direct activity, such as an association with a 46566-target molecule. As used herein, a "substrate" or "target molecule" or "binding partner" is a molecule with which a 46566 protein binds or interacts in nature, such that 46566-mediated function, *e.g.*, modulation of a pain signaling mechanism, is achieved. A 46566 target molecule can be a non-46566 molecule (*e.g.*, NAD+, NADP+, or other cofactor, or a biochemical molecule
- 10 involved in a pain signaling mechanism), or a 46566 protein or polypeptide. Examples of such target molecules include proteins in the same signaling path as the 46566 protein, *e.g.*, proteins which may function upstream (including both stimulators and inhibitors of activity) or downstream of the 46566 protein in a pain signaling pathway. Alternatively, a 46566 activity is an indirect activity, such as a cellular signaling activity mediated by
- 15 interaction of the 46566 protein with a 46566 target molecule. The biological activities of 46566 are described herein. For example, the 46566 proteins have one or more of the following activities: (1) regulation of Ca^{2+} production in a cell, *e.g.*, to be used as a second messenger in a signal transduction cascade; (2) modulation of a pain signaling mechanism;
- 20 (3) modulation of neurotransmitter release; (4) modulation of synaptic, *e.g.*, spontaneous synaptic, activity; (5) regulation of sodium exchange in a cell to be used as a second messenger in a signal transduction cascade.

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

25 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 46566 antisense molecules) which bind to 46566 proteins, have a stimulatory or inhibitory effect on 46566 expression or 46566

30 activity, or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of a 46566 target molecule. Compounds identified using the assays described herein may be useful for treating pain disorders.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Candidate/test compounds include, for example, 1) peptides such as soluble peptides, including Ig-tailed fusion peptides and members of random peptide libraries (see, e.g., Lam, K.S. *et al.* (1991) *Nature* 354:82-84; Houghten, R. *et al.* (1991) *Nature* 354:84-86) and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-configuration amino acids; 2) phosphopeptides (e.g., members of random and partially degenerate, directed phosphopeptide libraries, see, e.g., Songyang, Z. *et al.* (1993) *Cell* 72:767-778); 3) antibodies (e.g., polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric, and single chain antibodies as well as Fab, F(ab')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 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 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.* 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), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310; Ladner *supra*).

WO 03/037254

PCT/US02/34567

In one aspect, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a 46566 protein or biologically active portion thereof is contacted with a test compound and the ability of the test compound to modulate 46566 activity is determined. In a preferred embodiment, the biologically active portion of the 46566 protein includes a domain or motif that can modulate pain and/or inflammation. Determining the ability of the test compound to modulate 46566 activity can be accomplished by monitoring, for example, modulation of pain and/or inflammation. The cell, for example, can be of mammalian origin.

The ability of the test compound to modulate 46566 binding to a substrate can also be determined. Determining the ability of the test compound to modulate 46566 binding to a substrate can be accomplished, for example, by coupling the 46566 substrate with a radioisotope, fluorescent, or enzymatic label such that binding of the 46566 substrate to 46566 can be determined by detecting the labeled 46566 substrate in a complex.

Alternatively, 46566 could be coupled with a radioisotope or enzymatic label to monitor the ability of a test compound to modulate 46566 binding to a 46566 substrate in a complex. Determining the ability of the test compound to bind 46566 can be accomplished, for example, by coupling the compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the compound to 46566 can be determined by detecting the labeled 46566 compound in a complex. For example, 46566 substrates can be labeled with ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, 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 46566 without the labeling of any of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect the interaction of a compound with 46566 without the labeling of either the compound or the 46566 (McConnell, H. M. *et al.* (1992) *Science* 257:1906-1912). As used herein, a "microphysiometer" (e.g., Cytosensor) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a compound and 46566.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Because 46566 expression is downregulated in dorsal root ganglia (DRG) after axotomy, compounds which modulate pain and/or inflammation can be identified by the ability to modulate 46566 expression. To determine whether a test compound modulates 46566 expression, a cell which expresses 46566 is contacted with a test compound, and the ability of the test compound to modulate 46566 expression can be determined by measuring 46566 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 46566 can be linked to a reporter gene such as chloramphenicol acetyltransferase (CAT) or luciferase and introduced into host cells. The same host cells can then be transfected with or contacted with the test compound. The effect of the test compound can be measured by reporter gene activity and comparison 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 46566 expression and is, therefore, an indicator of the ability of the test compound to modulate pain and/or inflammation.

Assays that may be used to identify compounds that modulate 46566 activity also include assays that test for the ability of a compound to modulate pain and/or inflammation. The ability of a test compound to modulate pain and/or inflammation can be measured by its ability to modulate inflammation of the tissues surrounding the site of injury.

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay in which a 46566 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 46566 protein or biologically active portion thereof is determined. Preferred biologically active portions of the 46566 proteins to be used in assays of the present invention include fragments that participate in interactions with non-46566 molecules, e.g., fragments with high surface probability scores. Binding of the test compound to the 46566 protein can be determined either directly or indirectly as described above. Determining the ability of the 46566 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.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

In yet another embodiment, the cell-free assay involves contacting a 46566 protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds the 46566 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 46566 protein, wherein

5 determining the ability of the test compound to interact with the 46566 protein comprises determining the ability of the 46566 protein to preferentially bind to or modulate the activity of a 46566 target molecule (e.g., a 46566 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., 46566 proteins or biologically active portions thereof). In the

10 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-dodecylglucoside, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton® X-100, Triton® X-

15 114, Thesit®, Isotridecyloxy(ethylene glycol ether)_n, 3-[3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate (CHAPS), 3-[3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO), or 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 46566 or a 46566 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 46566 protein, or interaction of a 46566 protein with a 46566 target molecule in the presence and absence of a test compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the

20 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, glutathione-S-transferase/46566 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 46566 protein, and the mixture incubated under conditions conducive to complex formation (e.g.,

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 matrix, and the level of 46566 binding or activity determined using standard techniques.

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 46566 protein or a 46566 target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated 46566 protein or target molecules can be prepared 10 from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, IL), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which are reactive with 46566 protein or target molecules but which do not interfere with binding of the 46566 protein to its target molecule can be derivatized to the wells of the plate, and 15 unbound target or 46566 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 46566 protein or target molecule, as well as enzyme-linked assays which rely on detecting an enzymatic activity associated with the 46566 protein or target molecule.

20 In yet another aspect of the invention, the 46566 protein or fragments thereof can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300) to identify other proteins which bind to 25 or interact with 46566 ("46566-binding proteins" or "46566-bp) and are involved in 46566 activity. Such 46566-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the 46566 proteins or 46566 targets as, for example, downstream elements of a 46566-mediated signaling pathway. Alternatively, such 46566-binding proteins are likely to be 46566 inhibitors.

30 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 46566 protein is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 46566-dependent complex, the 5 DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (*e.g.*, LacZ) which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the 10 protein that interacts with the 46566 protein.

In another aspect, the invention pertains to a combination of two or more of the assays described herein. For example, a modulating agent can be identified using a cell-based or a cell-free assay, and the ability of the agent to modulate the activity of a 46566 protein can be confirmed *in vivo*, *e.g.*, in an animal such as an animal model for chronic 15 pain and/or neuropathic pain.

Moreover, a 46566 modulator identified as described herein (*e.g.*, an antisense 46566 nucleic acid molecule, a 46566-specific antibody, or a small molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such a modulator. Alternatively, a 46566 modulator identified as described herein can be 20 used in an animal model to determine the mechanism of action of such a modulator.

The ability of a given modulating agent to modulate pain can be quantitated by using any one of the following tests: tight ligation of L6 and L7, as a model of neuropathic pain; complete Freund's adjuvant into knee joint or hind paw as a model of Long term inflammatory pain (Palecek, J. (1992) *Neurophysiol* 68:1951-66); nerve ligation (CCI); 25 thermal hyperalgesia, tactile allodynia and cold allodynia (Carlton, S.M. *et al.* (1994) *Pain* 56:155-66); thermal paw withdrawal latency (Hargreaves test); von Frey mechanical withdrawal threshold; the hot-plate latency test; the tail flick test (Stone, L.S., *et al.* (1997) *NeruroReport* 8:3131-3135); the warm-water immersion tail flick assay (Stone, L.S., *et al.* (1997) *NeruroReport* 8:3131-3135); the crush injury to the sciatic nerve test (De Konig, *et* 30 *al.* (1986) *J. Neurol. Sci.* 74:237-246); the cold water allodynia test (Hunter, *et al.* (1997) *Pain* 69:317-322; the paw pressure latency assay (Hakki-Onen, S., *et al.* (2001) *Brain Research* 900(2):261-7; or the radiant heat test (Yoshimura, M., (2001) *Pharm. Research* 44(2):105-11.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Briefly, the tail flick latency test involves projecting a beam of light to the tail of an animal. The time is measured from the onset of the tail heating and stops at the moment of the tail flick. Typically, five tail flick latency (TFL) measurements are made per rat per session with 5-10 minutes between trials.

5 The thermal paw withdrawal latency test, also known as the Hargreaves test, consists of directing a light beam onto the ventral surface of the rats' left hindpaw from below and measuring the time until the paw is reflexively moved away from the light.

10 The von Frey mechanical withdrawal threshold involves placing the rat on a screen surface and attaching a von Frey filament to a force transducer. The filament is pressed upward against the ventral right hindpaw of the animal to measure the force at the instant of paw withdrawal.

15 The hot-plate latency test involves placing a rat onto a heated surface and measuring the time it takes the animal to jump or to lick a hindpaw.

20 Animal models for pain or inflammation may also be produced by the following methods: subcutaneous injection of formalin, lambda-carrageenan, Mustard oil, or complete Freund's adjuvant (CFA) into the right hind paw or knee of an animal, which causes inflammatory pain; chronic constriction of the sciatic nerve of an animal, which induces neuropathic pain; dibutyryl dichloride injection in an animal, which causes chronic pancreatic inflammation; axotomy of the sciatic nerve or the tibial nerve of an animal; or chronic constriction of the spinal nerves of an animal which induces neuropathic pain.

25 The ability of a given modulating agent to moderate the Na-Ca exchange can be quantitated by using a calcium uptake assay. The assay is performed with adult rat dorsal root ganglion cells and tests the exchange of radioactive Ca, as described by Wood *et al.* (1988) *J. Neurosci.* 8:3208-3220, herein incorporated by reference in its entirety.

25

II. Predictive Medicine:

30 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 46566 protein and/or nucleic acid expression as well as 46566 activity, in the context of a biological sample (e.g., blood, serum, cells, or tissue, e.g., neural tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a pain disorder. The invention also provides for prognostic

WO 03/037254

PCT/US02/34567

(or predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a pain disorder. For example, mutations in a 46566 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 pain disorder.

5 Another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of 46566 modulators (e.g., anti-46566 antibodies or 46566 ribozymes) on the expression or activity of 46566 in clinical trials.

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

10 A. Diagnostic Assays For Pain Disorders

To determine whether a subject is afflicted with a pain 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 46566 protein or nucleic acid (e.g., mRNA or genomic DNA) that encodes a 46566 protein, in the biological sample. A preferred agent 15 for detecting 46566 mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to 46566 mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, the 46566 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 20 length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to 46566 mRNA or genomic DNA. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

A preferred agent for detecting 46566 protein in a sample is an antibody capable of binding to 46566 protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof 25 (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 30 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-

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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.

- 5 That is, the detection method of the invention can be used to detect 46566 mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of 46566 mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of 46566 protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of 46566 genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of 46566 protein include introducing into a subject a labeled anti-46566 antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.
- 15 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 46566 protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of 46566 protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of 46566 protein, mRNA or genomic DNA in the control sample
- 20 with the presence of 46566 protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

B. Prognostic Assays For Pain Disorders

The present invention further pertains to methods for identifying subjects having or at risk of developing a pain disorder, *e.g.*, a pain disorder associated with aberrant 46566 expression or activity.

- 25 As used herein, the term "aberrant" includes a 46566 expression or activity that deviates from the wild type 46566 expression or activity. Aberrant expression or activity includes increased or decreased expression or activity, as well as expression or activity that does not follow the wild type developmental pattern of expression or the subcellular
- 30 pattern of expression. For example, aberrant 46566 expression or activity is intended to include the cases in which a mutation in the 46566 gene causes the 46566 gene to be under-expressed or over-expressed and situations in which such mutations result in a non-functional 46566 protein or a protein which does not function in a wild-type fashion, *e.g.*, a

WO 03/037254

PCT/US02/34567

protein which does not interact with a 46566 substrate, or one which interacts with a non-46566 substrate.

The assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be used to identify a subject having or at risk of developing a pain disorder, *e.g.*, inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain. 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 46566 gene, 2) an addition of one or more nucleotides to a 46566 gene, 3) a substitution of one or more nucleotides of a 46566 gene, 4) a chromosomal rearrangement of a 46566 gene, 5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a 46566 gene, 6) aberrant modification of a 46566 gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, 7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a 46566 gene, 8) a non-wild type level of a 46566-protein, 9) allelic loss of a 46566 gene, and 10) 15) inappropriate post-translational modification of a 46566-protein.

As described herein, there are a large number of assays known in the art that can be used for detecting genetic alterations in a 46566 gene. For example, a genetic alteration in a 46566 gene may be detected using a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, 20) 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 46566 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, 25) mRNA or both) from the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers which specifically hybridize to a 46566 gene under conditions such that hybridization and amplification of the 46566 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 30) 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

In an alternative embodiment, mutations in a 46566 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 10 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.

15 In other embodiments, genetic mutations in 46566 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 46566 can be identified in two dimensional arrays 20 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 25 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 30 art can be used to directly sequence the 46566 gene in a biological sample and detect mutations by comparing the sequence of the 46566 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.*

WO 03/037254

PCT/US02/34567

- USA 74:560) or Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463). It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve, C. W. (1995) *Biotechniques* 19:448-53), including sequencing by mass spectrometry (see, e.g., PCT International Publication No. 5 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 46566 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 10 technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes formed by hybridizing (labeled) RNA or DNA containing the wild-type 46566 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 15 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 20 by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397 and Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol.* 217:286-295. In a preferred embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more 25 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 46566 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). 30 According to an exemplary embodiment, a probe based on a 46566 sequence, e.g., a wild-type 46566 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 46566 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 46566 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 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.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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

5 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 10 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.

15 Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered a 46566 modulator (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small molecule) to effectively treat a pain.

20 C. Monitoring of Effects During Clinical Trials

The present invention further provides methods for determining the effectiveness of a 46566 modulator (*e.g.*, a 46566 modulator identified herein) in treating a pain disorder in a subject. For example, the effectiveness of a 46566 modulator in increasing 46566 gene expression, protein levels, or in upregulating 46566 activity, can be monitored in clinical 25 trials of subjects exhibiting decreased 46566 gene expression, protein levels, or downregulated 46566 activity. Alternatively, the effectiveness of a 46566 modulator in decreasing 46566 gene expression, protein levels, or in downregulating 46566 activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased 46566 gene expression, protein levels, or 46566 activity. In such clinical trials, the expression or activity of a 30 46566 gene, and preferably, other genes that have been implicated in, for example, a pain 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 46566, that are modulated in cells by treatment with an agent which modulates 46566 activity (*e.g.*,

WO 03/037254

PCT/US02/34567

identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents which modulate 46566 activity on subjects suffering from a pain disorder in, for example, a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of 46566 and other genes implicated in the pain disorder. The 5 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 46566 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 10 46566 activity. This response state may be determined before, and at various points during treatment of the individual with the agent which modulates 46566 activity.

In a preferred embodiment, the present invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent that modulates 46566 activity (e.g., an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, or small 15 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 46566 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 46566 protein, mRNA, 20 or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the 46566 protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the 46566 protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or 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 25 or activity of 46566 to higher levels than detected, i.e., to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of 46566 to lower levels than detected, i.e., to decrease the effectiveness of the agent. According to such an embodiment, 46566 expression or activity may be used as an indicator of the effectiveness of an agent, even in the absence of an 30 observable phenotypic response.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

III. Methods of Treatment of Subjects Suffering From Pain 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 pain disorder such as inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain, for example, chronic pain disorders, fibromyalgia, migraine/headache pain, cancer pain, chronic fatigue syndrome, arthritis, complex regional pain syndrome, causalgia, neurodystrophy, or plantar fasciitis. As used herein, “treatment” of a subject includes the application or administration of a therapeutic agent to a subject, or application or administration of a therapeutic agent to a cell or tissue from a subject, who has a disease 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 to cure, heal, alleviate, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve, or affect the disease or disorder, the symptom of the disease or disorder, or the risk of (or susceptibility 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.

15 With regard to both prophylactic and therapeutic methods of treatment, such treatments may be specifically tailored or modified, based on knowledge obtained from the field of pharmacogenomics. “Pharmacogenomics,” as used herein, refers to the application of genomics technologies such as gene sequencing, statistical genetics, and gene expression analysis to drugs in clinical development and on the market. More specifically, 20 the term refers to the study of how a patient’s genes determine his or her response to a drug (*e.g.*, a patient’s “drug response phenotype”, or “drug response genotype”).

Thus, another aspect of the invention provides methods for tailoring a subject’s prophylactic or therapeutic treatment with either the 46566 molecules of the present invention or 46566 modulators according to that individual’s drug response genotype. 25 Pharmacogenomics allows a clinician or physician to target prophylactic or therapeutic treatments to patients who will most benefit from the treatment and to avoid treatment of patients who will experience toxic drug-related side effects.

A. Prophylactic Methods

30 In one aspect, the invention provides a method for preventing in a subject, a pain disorder by administering to the subject an agent which modulates 46566 expression or 46566 activity in a cell, *e.g.*, a neuron. Subjects at risk for developing a pain disorder can be identified by, for example, any or a combination of the diagnostic or prognostic assays

WO 03/037254

PCT/US02/34567

described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of symptoms characteristic of aberrant 46566 expression or activity, such that a pain disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of 46566 aberrancy, for example, a 46566 molecule, 46566 agonist or 46566 antagonist agent can be used for treating the subject. The 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 pain disorder. These methods involve administering to a subject an agent which modulates 46566 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 46566 protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced, aberrant, or unwanted 46566 expression or activity.

Stimulation of 46566 activity is desirable in situations in which 46566 is abnormally downregulated and/or in which increased 46566 activity is likely to have a beneficial effect. Likewise, inhibition of 46566 activity is desirable in situations in which 46566 is abnormally upregulated and/or in which decreased 46566 activity is likely to have a beneficial effect.

The agents which modulate 46566 activity can be administered to a subject using pharmaceutical compositions suitable for such administration. Such compositions typically comprise the agent (e.g., nucleic acid molecule, protein, or antibody) and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein the language "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like, compatible with pharmaceutical administration. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

A pharmaceutical composition used in the therapeutic methods of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, e.g., intravenous, intradermal, subcutaneous, oral

WO 03/037254

PCT/US02/34567

(e.g., inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents;

5 antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. pH can be adjusted with acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in

10 ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™.

15 (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 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,

20 glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens,

25 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.

30 Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the agent that modulates 46566 activity (e.g., a fragment of a 46566 protein or an anti-46566 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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

5 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 10 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 15 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.

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

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For 25 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.

30 The agents that modulate 46566 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.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

In one embodiment, the agents that modulate 46566 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 46566 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 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, 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 46566 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 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 pain, preferably about 0.01 to 25 mg/kg pain, more preferably about 0.1 to 20 mg/kg pain, 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 pain. The skilled artisan will appreciate that certain factors may influence the dosage required to effectively treat a subject, including but not limited to the severity of the disease or disorder, previous treatments, the general health and/or age of the subject, and other diseases present.

Moreover, treatment of a subject with a 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 pain, one time per week for between about 1 to 10 weeks, preferably between 2 to 8 weeks, more preferably between about 3 to 7 weeks, and even more preferably for about 4, 5, or 6 weeks. 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.

The present invention encompasses agents which modulate 46566 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) 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

per mole, organic or inorganic compounds having a molecular weight less than about 500 grams per mole, and salts, esters, and other pharmaceutically acceptable forms of such compounds. It is understood that appropriate doses of small molecule agents depends upon a number of factors within the ken of the ordinarily skilled physician, veterinarian, or researcher. The dose(s) of the small molecule will vary, for example, depending upon the identity, size, and condition of the subject or sample being treated, further depending upon the route by which the composition is to be administered, if applicable, and the effect which the practitioner desires the small molecule to have upon the nucleic acid or polypeptide of the invention. Exemplary doses include milligram or microgram amounts of the small molecule per kilogram of subject or sample weight (e.g., about 1 microgram per kilogram to about 500 milligrams per kilogram, about 100 micrograms per kilogram to about 5 milligrams per kilogram, or about 1 microgram per kilogram to about 50 micrograms per kilogram). It is furthermore understood that appropriate doses of a small molecule depend upon the potency of the small molecule with respect to the expression or activity to be modulated. Such appropriate doses may be determined using the assays described herein. When one or more of these small molecules is to be administered to an animal (e.g., a human) in order to modulate expression or activity of a 46566 polypeptide or nucleic acid molecule, 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 depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the age, pain, 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.

Further, an antibody (or fragment thereof) may be conjugated to a therapeutic moiety such as a cytotoxin, a therapeutic agent or a radioactive metal ion. A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, 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),

WO 03/037254

PCT/US02/34567

alkylating agents (e.g., mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan, dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (e.g., daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (e.g., dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (e.g., vincristine and vinblastine).

The conjugates of the invention can be used for modifying a given biological response, the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, alpha-interferon, beta-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator; or biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *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 For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells which produce the gene delivery system.

C. Pharmacogenomics

10 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 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 15 physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenomics studies in determining whether to administer an agent which modulates 46566 activity, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic regimen of treatment with an agent which modulates 46566 activity.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the 20 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 25 of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally-occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate aminopeptidase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, 30 sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

One pharmacogenomics approach to identifying genes that predict drug response, known as "a genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome consisting of already known gene-related markers (*e.g.*, a "bi-allelic" gene

WO 03/037254

PCT/US02/34567

- marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants). Such a high-resolution genetic map can be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, such a high resolution map can be generated from a combination of some ten million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of SNPs in their individual genome. In such a manner, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals.
- 15 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 46566 protein of the present invention), all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.
- 20 As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and the cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed

WO 03/037254

PCT/US02/34567

metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

Alternatively, a method termed the "gene expression profiling" can be utilized to 5 identify genes that predict drug response. For example, the gene expression of an animal dosed with a drug (e.g., a 46566 molecule or 46566 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 10 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 pain disorder with an agent which modulates 46566 activity.

15 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 20 46566 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 25 vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as 30 "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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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., 46566 proteins, mutant forms of 46566 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 46566 proteins in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, 46566 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 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 46566 activity assays, (e.g., direct assays or competitive assays described in detail below), or to generate antibodies specific for 46566 proteins. In a preferred embodiment, a 46566 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.

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

The methods of the invention may further use a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 46566 mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen which 5 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 10 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 46566 15 nucleic acid molecule of the invention is introduced, *e.g.*, a 46566 nucleic acid molecule within a recombinant expression vector or a 46566 nucleic acid molecule containing sequences which allow it to homologously recombine into a specific site of the host cell's genome. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to 20 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 46566 protein 25 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 30 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) a 46566 protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing a 46566 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 46566 protein has been introduced) in a suitable medium such that a 46566 protein is produced. 10 In another embodiment, the method further comprises isolating a 46566 protein from the medium or the host cell.

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

The cDNA sequence of the isolated human 46566 gene and the predicted amino 15 acid sequence of the human 46566 polypeptide are shown in Figures 1A-1B and in SEQ ID NOs:1 and 2, respectively. The coding region without the 5' or 3' untranslated regions of the human 2047 gene is shown in SEQ ID NO:3.

The methods of the invention include the use of isolated nucleic acid molecules that 20 encode 46566 proteins or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid fragments sufficient for use as hybridization probes to identify 46566-encoding nucleic acid molecules (*e.g.*, 46566 mRNA) and fragments for use as PCR primers for the 25 amplification or mutation of 46566 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 30 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, 46566 nucleic acid molecules can be isolated using standard hybridization and cloning techniques (*e.g.*, as described in Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., *Cold Spring*

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 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 46566 nucleotide sequences can be prepared by standard 10 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 15 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 20 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 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 the entire length 25 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 25 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 46566 protein, *e.g.*, a biologically active portion of a 46566 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 30 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

present invention comprises a nucleotide sequence which is greater than 50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-600, 600-700, 700-800, 800-900, 900-1000, 1000-1100 or more nucleotides in length and hybridizes under stringent hybridization conditions to a nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1.

5 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
10 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-
15 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,
20 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
25 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 Na₂PO₄, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; 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
30

WO 03/037254

PCT/US02/34567

hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less 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, $T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - (600/N)$, where N is the number of bases in the hybrid, and $[\text{Na}^+]$ is the concentration of

5 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 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),

10 detergents (e.g., SDS), chelating agents (e.g., EDTA), Ficoll, PVP and the like. When using nylon membranes, in particular, an additional preferred, non-limiting example of stringent hybridization conditions is hybridization in 0.25-0.5M NaH_2PO_4 , 7% SDS at about 65°C, followed by one or more washes at 0.02M NaH_2PO_4 , 1% SDS at 65°C, see e.g., Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995, (or alternatively 15 0.2X SSC, 1% SDS).

In preferred embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, e.g., the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress a 46566 protein, such as by measuring a level 20 of a 46566-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject e.g., detecting 46566 mRNA levels or determining whether a genomic 46566 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 46566 proteins as those encoded by the nucleotide 25 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 46566, e.g., functional and non-functional allelic variants. Functional allelic variants are 30 naturally occurring amino acid sequence variants of the human 46566 protein that maintain a 46566 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.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Non-functional allelic variants are naturally occurring amino acid sequence variants of the human 46566 protein that do not have a 46566 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.

5 The methods of the present invention may further use non-human orthologues of the human 46566 protein. Orthologues of the human 46566 protein are proteins that are isolated from non-human organisms and possess the same 46566 activity.

10 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 46566 (e.g., the sequence of SEQ ID NO:2) without altering the biological activity, 15 whereas an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the 46566 proteins of the present invention and other members of the short-chain dehydrogenase family are not likely to be amenable to alteration.

16 Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 by standard techniques, such as 20 site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids 25 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, 30 tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a 46566 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 46566 coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the

WO 03/037254

PCT/US02/34567

resultant mutants can be screened for 46566 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.

5 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, 10 an antisense nucleic acid can hydrogen bond to a sense nucleic acid. The antisense nucleic acid can be complementary to an entire 46566 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 46566. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into 15 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 46566. 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).

20 Given the coding strand sequences encoding 46566 disclosed herein, antisense nucleic acids of the invention can be designed according to the rules of Watson and Crick base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of 46566 mRNA, but more preferably is an oligonucleotide which is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of 46566 mRNA. For 25 example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of 46566 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 30 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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, 5 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-thiacytosine, 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 46566 protein to thereby inhibit expression of the protein, *e.g.*, by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid molecule which binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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'- α -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 46566 mRNA transcripts to thereby inhibit translation of 46566 mRNA. A ribozyme having specificity for a 46566-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a 46566 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 46566-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, 46566 mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, *e.g.*, Bartel, D. and Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.

Alternatively, 46566 gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the 46566 (*e.g.*, the 46566 promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the 46566 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 46566 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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

5 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.

10 PNAs of 46566 nucleic acid molecules can be used in the therapeutic and diagnostic applications described herein. For example, PNAs can be used as antisense or antigenic agents for sequence-specific modulation of gene expression by, for example, inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of 46566 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*).

15 In another embodiment, PNAs of 46566 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 46566 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 20 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 25 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 30 phosphoramidite, can be used as a between the PNA and the 5' end of DNA (Mag, M. *et al.*

WO 03/037254

PCT/US02/34567

(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: 1119-1124).

5 In other embodiments, the oligonucleotide used in the methods of the invention may include other appended groups such as peptides (*e.g.*, for targeting host cell receptors *in vivo*), or agents facilitating transport across the cell membrane (see, *e.g.*, Letsinger *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553-6556; Lemaitre *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, *e.g.*, PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified 10 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, 15 hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent).

VI. Isolated 46566 Proteins and Anti-46566 Antibodies Used in the Methods of the Invention

20 The methods of the invention include the use of isolated 46566 proteins, and biologically active portions thereof, as well as polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-46566 antibodies. In one embodiment, native 46566 proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, 46566 proteins are 25 produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a 46566 protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

As used herein, a "biologically active portion" of a 46566 protein includes a 30 fragment of a 46566 protein having a 46566 activity. Biologically active portions of a 46566 protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently identical to or derived from the amino acid sequence of the 46566 protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2, which include fewer amino acids than the full length 46566 proteins, and exhibit at least one activity of a 46566 protein. Typically, biologically

WO 03/037254

PCT/US02/34567

active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the 46566 protein. A biologically active portion of a 46566 protein can be a polypeptide which is, for example, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300 or more amino acids in length. Biologically active portions of a 46566 protein can be used as targets for developing agents

5 which modulate a 46566 activity.

In a preferred embodiment, the 46566 protein used in the methods of the invention has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. In other embodiments, the 46566 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 10 or mutagenesis, as described in detail in subsection V above. Accordingly, in another embodiment, the 46566 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%, 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.

15 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 20 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 46566 amino acid sequence of SEQ ID NO:2 having 244 amino acid residues, at least 93, preferably at least 124, more preferably at least 156, even more preferably at least 187, and 25 even more preferably at least 200, 210, 215 or more amino acid residues are aligned). The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino 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 30 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.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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 5 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 10 <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 15 of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0 or 2.0U), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4.

The methods of the invention may also use 46566 chimeric or fusion proteins. As used herein, a 46566 "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a 46566 polypeptide operatively linked to a non-46566 polypeptide. A "46566 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a 46566 molecule, whereas a 20 "non-46566 polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein which is not substantially homologous to the 46566 protein, e.g., a protein which is different from the 46566 protein and which is derived from the same or a different organism. Within a 46566 fusion protein the 46566 polypeptide can correspond to all or a portion of a 46566 protein. In a preferred embodiment, a 46566 25 fusion protein comprises at least one biologically active portion of a 46566 protein. In another preferred embodiment, a 46566 fusion protein comprises at least two biologically active portions of a 46566 protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the 46566 polypeptide and the non-46566 polypeptide are fused in-frame to each other. The non-46566 polypeptide can be fused to the N-terminus or C- 30 terminus of the 46566 polypeptide.

For example, in one embodiment, the fusion protein is a GST-46566 fusion protein in which the 46566 sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant 46566. In another

WO 03/037254

PCT/US02/34567

embodiment, this fusion protein is a 46566 protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of 46566 can be increased through use of a heterologous signal sequence.

The 46566 fusion proteins used in the methods of the invention can be incorporated 5 into pharmaceutical compositions and administered to a subject *in vivo*. The 46566 fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a 46566 substrate. Use of 46566 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 46566 protein; (ii) mis-regulation of the 46566 gene; and (iii) aberrant post-translational modification of a 10 46566 protein.

Moreover, the 46566-fusion proteins used in the methods of the invention can be used as immunogens to produce anti-46566 antibodies in a subject, to purify 46566 ligands and in screening assays to identify molecules which inhibit the interaction of 46566 with a 46566 substrate.

15 Preferably, a 46566 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- 20 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 25 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 30 available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). A 46566-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the 46566 protein.

The present invention also pertains to the use of variants of the 46566 proteins which function as either 46566 agonists (mimetics) or as 46566 antagonists. Variants of the 46566 proteins can be generated by mutagenesis, e.g., discrete point mutation or

WO 03/037254

PCT/US02/34567

truncation of a 46566 protein. An agonist of the 46566 proteins can retain substantially the same, or a subset, of the biological activities of the naturally occurring form of a 46566 protein. An antagonist of a 46566 protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the 46566 protein by, for example, competitively modulating a 5 46566-mediated activity of a 46566 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 46566 protein.

10 In one embodiment, variants of a 46566 protein which function as either 46566 agonists (mimetics) or as 46566 antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, e.g., truncation mutants, of a 46566 protein for 46566 protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of 46566 variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a 15 variegated gene library. A variegated library of 46566 variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential 46566 sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of 46566 sequences therein. There are a variety of methods 20 which can be used to produce libraries of potential 46566 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 46566 sequences.

25 Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang, S.A. (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

In addition, libraries of fragments of a 46566 protein coding sequence can be used to generate a variegated population of 46566 fragments for screening and subsequent 30 selection of variants of a 46566 protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a 46566 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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

5 fragments of various sizes of the 46566 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 46566

10 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

15 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 46566 variants (Arkin and Youvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delagrange *et al.* (1993) *Prot. Eng.* 6(3):327-331).

The methods of the present invention further include the use of anti-46566

20 antibodies. An isolated 46566 protein, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that bind 46566 using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. A full-length 46566 protein can be used or, alternatively, antigenic peptide fragments of 46566 can be used as immunogens. The antigenic peptide of 46566 comprises at least 8 amino acid residues of the amino acid

25 sequence shown in SEQ ID NO:2 and encompasses an epitope of 46566 such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the 46566 protein. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

30 Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of 46566 that are located on the surface of the protein, *e.g.*, hydrophilic regions, as well as regions with high antigenicity.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

A 46566 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 46566 protein or a chemically synthesized 46566 polypeptide. The preparation can further 5 include an adjuvant, such as Freund's complete or incomplete adjuvant, or similar immunostimulatory agent. Immunization of a suitable subject with an immunogenic 46566 preparation induces a polyclonal anti-46566 antibody response.

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain 10 an antigen binding site which specifically binds (immunoreacts with) an antigen, such as a 46566. 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 46566 molecules. The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody 15 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 46566. A monoclonal antibody composition thus typically displays a single binding affinity for a particular 46566 protein with which it immunoreacts.

Polyclonal anti-46566 antibodies can be prepared as described above by 20 immunizing a suitable subject with a 46566 immunogen. The anti-46566 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 46566. If desired, the antibody molecules directed against 46566 can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A 25 chromatography to obtain the IgG fraction. At an appropriate time after immunization, *e.g.*, when the anti-46566 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; 30 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*,

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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; 5 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 46566 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 46566.

10 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-46566 monoclonal antibody (see, *e.g.*, G. Galfré *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* (1977) *supra*; Lerner (1981) *supra*; and Kenneth (1980) *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also 15 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 20 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 25 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 46566, *e.g.*, using a standard ELISA assay.

30 Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal anti-46566 antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with 46566 to thereby isolate immunoglobulin library members that bind 46566. Kits for generating

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; 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-46566 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.* (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 5,225,539; Jones *et al.* (1986)

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Nature 321:552-525; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

An anti-46566 antibody can be used to detect 46566 protein (*e.g.*, in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the 46566 protein. Anti-46566 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, dichlorotrizinylamine 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 ^{3}H .

VII. Electronic Apparatus Readable Media and Arrays

20 Electronic apparatus readable media comprising a 46566 modulator of the present invention is also provided. As used herein, "electronic apparatus readable media" refers to any suitable medium for storing, holding or containing data or information that can be read and accessed directly by an electronic apparatus. Such media can include, but are not limited to: magnetic storage media, such as floppy discs, hard disc storage medium, and 25 magnetic tape; optical storage media such as compact disc; electronic storage media such as RAM, ROM, EPROM, EEPROM and the like; general hard disks and hybrids of these categories such as magnetic/optical storage media. The medium is adapted or configured for having recorded thereon a marker of the present invention.

As used herein, the term "electronic apparatus" is intended to include any suitable 30 computing or processing apparatus or other device configured or adapted for storing data or information. Examples of electronic apparatus suitable for use with the present invention include stand-alone computing apparatus; networks, including a local area

WO 03/037254

PCT/US02/34567

network (LAN), a wide area network (WAN) Internet, Intranet, and Extranet; electronic appliances such as a personal digital assistants (PDAs), cellular phone, pager and the like; and local and distributed processing systems.

As used herein, "recorded" refers to a process for storing or encoding information 5 on the electronic apparatus readable medium. Those skilled in the art can readily adopt any of the presently known methods for recording information on known media to generate manufactures comprising the 46566 modulators of the present invention.

A variety of software programs and formats can be used to store the marker 10 information of the present invention on the electronic apparatus readable medium. For example, the nucleic acid sequence corresponding to the 46566 modulators can be 15 represented in a word processing text file, formatted in commercially-available software such as WordPerfect and MicroSoft Word, or represented in the form of an ASCII file, stored in a database application, such as DB2, Sybase, Oracle, or the like, as well as in other forms. Any number of dataprocessor structuring formats (e.g., text file or database) 20 may be employed in order to obtain or create a medium having recorded thereon the 46566 modulators of the present invention.

By providing the 46566 modulators of the invention in readable form, one can 25 routinely access the marker sequence information for a variety of purposes. For example, one skilled in the art can use the nucleotide or amino acid sequences of the present invention in readable form to compare a target sequence or target structural motif with the 30 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.

The present invention therefore provides a medium for holding instructions for 25 performing a method for determining whether a subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder, wherein the method comprises the steps of determining the presence or absence of a 46566 modulator and based on the presence or absence of the 46566 modulator, determining whether the subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder and/or recommending a particular treatment for the pain disorder or pre- 30 pain disorder condition.

The present invention further provides in an electronic system and/or in a network, a method for determining whether a subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder associated with a 46566 modulator wherein the method comprises the steps

WO 03/037254

PCT/US02/34567

of determining the presence or absence of the 46566 modulator, and based on the presence or absence of the 46566 modulator, determining whether the subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder, and/or recommending a particular treatment for the pain disorder or pre-pain disorder condition. The method may further comprise the step of

5 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 pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder associated with a 46566 modulator, said method comprising the steps of receiving information associated with the 46566 modulator receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to the 46566 modulator and/or pain disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 46566 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder. The method may further comprise the step of

10 recommending a particular treatment for the pain disorder or pre- pain disorder condition.

The present invention also provides a business method for determining whether a subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder, said method comprising the steps of receiving information associated with the 46566 modulator, receiving phenotypic information associated with the subject, acquiring information from the network corresponding to the 46566 modulator and/or pain disorder, and based on one or more of the phenotypic information, the 46566 modulator, and the acquired information, determining whether the subject has a pain disorder or a pre-disposition to a pain disorder. The method may further comprise the step of recommending a particular treatment for the pain disorder or pre-pain disorder condition.

25 The invention also includes an array comprising a 46566 modulator 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. This allows a profile to be developed showing a

30 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

WO 03/037254

PCT/US02/34567

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.

15 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 pain disorder, progression of pain disorder, and processes associated with a pain disorder.

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

25 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, as well as the Figures and the Sequence Listing, are incorporated herein by reference.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

EXAMPLES**EXAMPLE 1: 46566 EXPRESSION IN HUMAN TISSUES**5 ***Materials and Methods***

For analysis of human 46566 expression, the following methods were used.

Tissues were collected from various human tissues. Total 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 10 reverse transcriptase resulted in samples with no detectable PCR amplification of the control 18S RNA gene confirming efficient removal of genomic DNA contamination. 46566 expression was measured by TaqMan® quantitative PCR analysis, performed according to the manufacturer's directions (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA).

15 PCR probes were designed by PrimerExpress software (PE Biosystems) based on the sequence of human 46566 (SEQ ID NO:1).

To standardize the results between different tissues, two probes, distinguished by different fluorescent labels, were added to each sample. The differential labeling of the probe for the 46566 gene and the probe for 18S RNA as an internal control thus enabled 20 their simultaneous measurement in the same well. Forward and reverse primers and the probes for both 18S RNA and human or murine 46566 were added to the TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). Although the final concentration of 25 primer and probe could vary, each was internally consistent within a given experiment. A typical experiment contained 200 nM of forward and reverse primers, plus 100 nM of the probe for the 18S RNA, and 4500 nM of each of the forward and reverse primers, plus 150 nM of the probe for murine NCE-SLC24A. TaqMan matrix experiments were carried out using an ABI PRISM 770 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems). The thermal cycler conditions were as follows: hold for 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by two-step PCR for 40 cycles of 95°C for 15 seconds, followed by 60°C 30 for 1 minute.

The following method was used to quantitatively calculate human 46566 gene expression in the tissue samples, relative to the 18S RNA expression in the same tissue. The threshold values at which the PCR amplification started were determined using the

WO 03/037254

PCT/US02/34567

manufacturer's software. PCR cycle number at threshold value was designated as CT.

Relative expression was calculated as:

$$2^{-(CT_{\text{test}}-CT_{18S})_{\text{tissue of interest}} - (CT_{\text{test}}-CT_{18S})_{\text{lowest expressing tissue in panel}}}$$

5

Samples were run in duplicate and the averages of 2 relative expression determinations are shown. All probes were tested on serial dilutions of RNA from a tissue with high expression levels and only probes which gave relative expression levels that were linear to the amount of template cDNA with a slope similar to the slope for the 10 internal control 18S were used.

Results

46566 was most highly expressed in nervous tissues. The highest levels of 46566 expression were found in the brain, followed by the spinal cord and dorsal root ganglia 15 (DRG). *In situ* hybridization using a human probe confirmed the foregoing TaqMan data.

The results described above demonstrate that 46566 is a relatively brain specific gene.

**EXAMPLE 2: 46566 EXPRESSION IN RAT TISSUES DERIVED FROM
20 ANIMAL MODELS FOR PAIN**

Materials and Methods
For analysis of rat 46566 expression, the methods described in Example 1 were used.

25

Results

TaqMan analysis using various rat tissues demonstrated that, 46566, like the human counterpart, is expressed in nervous tissues and showed the same pattern of expression as in the human panel (described in Example 1).

30 Expression of 46566 in animal models for pain/inflammation was also determined. One of the models used was the nerve ligation model (CCI), wherein chronic loose constriction of the sciatic nerve of the animal induces neuropathic pain. Nerve damage

WO 03/037254

PCT/US02/34567

results in sensory hypersensitivity or prolonged lowering of the primary afferent nociceptor threshold (hyperalgesia). Furthermore, after axonal injury, mechanical and thermal allodynia develop. Another animal-based paradigm used was the complete Freund's adjuvant (CFA) model, wherein CFA injection in the rodent paw or monkey knee joint 5 induces an inflammatory response with the development of altered pain responses manifested as reduced threshold to noxious stimuli (hyperalgesia) and lowered thresholds to innocuous stimuli (allodynia).

The results from these experiments indicate that there was no regulation of 46566 in the spinal cord of CCI animals and some down-regulation in the CFA induced model of 10 inflammatory pain. A more pronounced down-regulation of 46566 was observed in animals after axotomy.

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 15 invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

What is claimed:

1. A method for identifying a compound capable of treating a pain disorder, comprising assaying the ability of the compound to modulate 46566 nucleic acid expression or 46566 polypeptide activity, thereby identifying a compound capable of treating a pain disorder.
2. A method for identifying a compound capable of modulating a pain signaling mechanism comprising:
 - 10 a) contacting a cell which expresses 46566 with a test compound; and b) assaying the ability of the test compound to modulate the expression of a 46566 nucleic acid or the activity of a 46566 polypeptide, thereby identifying a compound capable of modulating pain signalling.
 - 15 3. A method for modulating a pain signaling mechanism in a cell comprising contacting a cell with a 46566 modulator, thereby modulating a pain signaling mechanism in the cell.
 - 20 4. The method of claim 2, wherein the cell is a brain cell, neuron, or cell derived from spinal cord or dorsal root ganglion.
 - 25 5. The method of claim 3, wherein the 46566 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
 - 30 6. The method of claim 3, wherein the 46566 modulator is capable of modulating 46566 polypeptide activity.
 7. The method of claim 6, wherein the 46566 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.
 8. The method of claim 6, wherein the 46566 modulator is capable of modulating 46566 nucleic acid expression.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

9. A method for treating a subject having a pain disorder characterized by aberrant 46566 polypeptide activity or aberrant 46566 nucleic acid expression comprising administering to the subject a 46566 modulator, thereby treating said subject having a pain disorder.

5

10. The method of claim 9, wherein said pain disorder includes inflammatory pain, chronic pain, neuropathic pain, causalgia, fibromyalgia, cancer pain, migraine/headache pain and tissue pain.

10

11. The method of claim 9, wherein said 46566 modulator is administered in a pharmaceutically acceptable formulation.

12. The method of claim 9, wherein the 46566 modulator is a small organic molecule, peptide, antibody or antisense nucleic acid molecule.

15

13. The method of claim 9, wherein the 46566 modulator is capable of modulating 46566 polypeptide activity.

WO 03/037254

PCT/US02/34567

FIGURE 1A

WO 03/037254

PCT/US02/34567

TCCTGGGGAGTTAAGGTCTCTCCTGGTACCCAGCCTGGCTTGGCCCCCAAAGTCT
 CCTCTCCCTAGTGACCCCCCCCCACTTCACCCCAATGTCAGGCCAGGGCTCAGAACCCACCC
 CCTCTGGGGACCCCTGAGGGAGCTGAGGGCCGCTCAGCTCCAGGCCCTTCCCC
 CAGCCCCCAGGGAGCTCCGGTCAAGCCCCGGGGAGAGGGGTGCGCCCAAAG
 GAGGCCACACCTTCTCCATCCCTCCACTTGGGTTCTGGGAGGACACTCT
 CCAGGCTGGAGACAGGGAGAGGTTCAGGGTTTCAGTCCAGGGCTTAGCCGAGGAA
 GCACATTTGAACCTGCAACTTCAGACATTCAGCTCCCCACTCGCCCTCACTACCTC
 TGAGHGCCACCCACGCCTGGAGGGAGGGCTTGAGTGTATAATAGTGIGTTGGGG
 AGGGGGAGCCGGAGGGTCAATGCTTGGGAAAAGGGGTGACAGACAAACTTTGAGAG
 GGCAGCAGACTCCCTCAGCCATGAGAACCACTTGGGAGGAGCCGGAATCAAGCG
 AGTCCAGTTGAGCTTCCCTGACAACTTGAGAAGGTTCACTTTGGCCCTCAGTGCCAGCCAT
 CCGGGCAGGACCTCTGAGAGAGCCAGGGGCCAGAGGACCAATGCTAACAGCG
 AAATGCTGCCACATCTGGCTGATGCGGGGTGGGGATGGGACTGGC
 CAAGGGATCNGGTGGCATTTTCACTGCTGGGAAAGGACACATTGGGAGTGGCCACT
 GCATTTCTTACTGTTGATGTTTCCTGCGAAACGACACATTGGGAGTGGCCACT
 CCTTGGGCCCTAGGGATGACCCACTACCCCCATAACTTTCTGCTTCCCACAGGTTTCA
 GCATTCTATGCTCTGTGTCGAGCCCCAACATCCAGACCCGTTACCCGCTACCCCT
 CTCCTCCCCAGCTCATCATCAGTCGCTGCTCTCTGTAATTCTGCTCTGCTCT
 TAAAACCTTGAATTCCTGCTCT

FIGURE 1A (Continued)

> 46566 protein
 MAPLALWGVTLILAAAPPCSGAATPTPSLPPPPANDSPTSTGGCCQGSYRCQPGVLLPVWEPDDPSLGDKAARAVVYFVA
 MVYMFGLVSIAIDRMAATEVITSKERKEETTTKANGETSVGTVRINNETVSNLITLMAIGSSAPEIILSVIEVCGHNPQ
 AGELGPGTIVGSAAFNNMFWVIIACIVYLIPAGESRKIKHLRVPFVTAWSMISFAYVWLYLLIAVFSHGVVQVWEALLTIV
 FFPVCVVFIAWADKRLFYKYYVYKRYRDTDPRSGIIIGAECDPPKSIELDCTFVGAEPGELOGLGPQPAABEELDASR
 REVIOJLKDOKHDKDIFLWLGVANVYVALLHQKSRAYRIQATRLMTGAGNVLARRHADASRRAPAEAGASDED
 DGASRIPFEPISLYHCLBNCCSVLISVTCQGGGNSTFYDVTYRTEGDSAKAGSDYKSEGJLVPKGBTQKELRIGITID
 DDIIPBDEHFFVVRLLNLRVGDAQGMFEPDGGRPKGRVAPILATVITLDDHAGIPSFQDRLLHVSECMTGTVDV/RV
 RSSGARGTVRLPYKTVDTGATRGGGVHYEDACGELEFGDDETMKTLQVKIVDDEYEKDNFFIELCOPQWLRKGISAL
 LLNGDGDKRKLTAEEESARRIEMGKPVLGENSELEVIIIESYDFKNTVDKLIKKTNLALVIGTHSWREOFLEAITVS
 AGDEEEEDGSRERFLPSCFDYVMHFLTVFWKVLFCAPVPTTEYCHGWACPGVSLVVLGLLTALIIGDLASHFCTVGLK
 SVNAVVFVALGTSIPDTFASKVVAIDQCCADASIGNVIGNSAVNVFLCLGVAMSVAAYVWAVQGRPFEVRLGTLAFS
 VTLFTVAFVGIAVLLYRRRPHIICGELGGPRCPKPLATLALFLGLMNLLYILPASLAEVCHIRGF.

FIGURE 1B

WO 03/037254

PCT/US02/34567

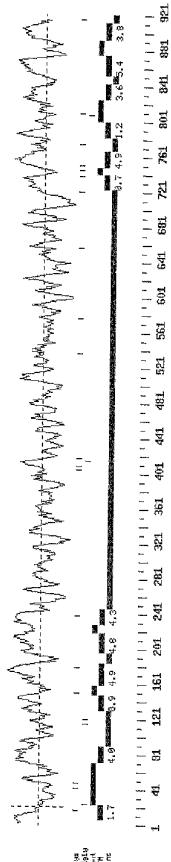


FIGURE 2

WO 03/037254

PCT/US02/34567

SEQUENCE LISTING

≤110z Silos-Santiago, Intaculada

<120> Methods and compositions for the treatment and diagnosis of pain disorders using 46566

<130> MPI01-272

<150> 60/335,078
<151> 2001-10-31

<160> 3

<170> FastSEO for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 4282

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 1

WO 03/037254

PCT/US02/34567

acgggtgttctt ggaagggtgct cttcgccgtgt gtgcggccca ccgagttactt ccacggctgg 2340
 gctgtgtttt gttgttccat cttgtgtatc ggcgttgcgtca ccgccttcat tggggaccc 2400
 gcttccactt tgggtgtgtac cgttggccctt aaggacttctt tcaatgtgt tggttttgcgt 2460
 gcccggcgtca cttccatccc tgacacgttc gcccggcaagg tggccggcgtt gcaaggccagg 2520
 tggcccaacgtt cgttcatcgaa caacgttggcc ggttcaacgg cgggtgaacgtt gttcccttgcc 2580
 ctggccgttcg cttgtgtgttgcgtt ggcggccatcgtt tggccggccgg tggccggccgg cccttccatc 2640
 gtgcggcaactt gcaacgttggc cttgtgtgttgcgtt aacgttcttca ccgttccatcgtt cttgtgtggc 2700
 atggccgtgtc tggctgttcccg ggcggccggc cccatcgccg gggaggtggg cggccggccgc 2760
 ggacccaaggc tggccacacc cccgttccatcgtt cttggccgtt ggttccatcgtt cttgttccatc 2820
 gccaggccatgg agggacttcttccatcgccgg ggttccatcgaa ggttccatcgaa ggttccatcgaa 2880
 cccacccccc gggccggggggt agggacttgcgtt cttggccgtt tggccgttccatc 2940
 ttcccccggcc actggccatc cttccatcgaa actggccatc cttttccatcggcccccctt 3000
 ggcttggatt ggcggccatcgtt tggccatccc tttttccatcgtt cttccatcgtt cttccatcgtt 3060
 ggcctccatgg tttttccatcgtt gggccggccatcgtt cccatccatcgtt ggttccatcgaa 3120
 tttttccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 3180
 tccctggggat tttttccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 3240
 cccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3300
 tttttccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3360
 cccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3420
 gggccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3480
 ccacccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3540
 gacatctttt aacccatccatcgtt cccatccatcgtt cccatccatcgtt cccatccatcgtt 3600
 tgagagccca gcaacccatcgtt cccatccatcgtt cccatccatcgtt ggttccatcgtt 3660
 agggggggccg cggggggggat cttttccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 3720
 ggcacccatcgtt cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 3780
 agtccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3840
 cccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 3900
 aaatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 3960
 caaggatcatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 4020
 gatccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 4080
 cttttccatcgtt cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt cccatccatcgtt 4140
 gatccatccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 4200
 ctcccccggcc gttttccatcgtt aatggccatc cccatccatcgtt cccatccatcgtt gggccatccatcgtt 4260
 taaaactttt aatccatcgtt tg 4282

<210> 2
 <211> 921
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 2
 Met Ala Pro Leu Ala Leu Val Gly Val Thr Leu Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15
 Pro Cys Ser Gly Ala Ala Thr Pro Thr Pro Ser Leu Pro Pro Pro Pro
 20 25 30
 Ala Asn Asp Ser Asp Thr Ser Thr Gly Gly Cys Gln Gly Ser Tyr Arg
 35 40 45
 Cys Cln Pro Gly Val Leu Leu Pro Val Trp Glu Pro Asp Asp Pro Ser
 50 55 60
 Leu Gly Asp Lys Ala Ala Arg Ala Val Val Tyr Phe Val Ala Met Val
 65 70 75 80
 Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser Ile Ile Ala Asp Arg Phe Met Ala Ala
 85 90 95
 Ile Glu Val Ile Thr Ser Lys Glu Lys Glu Ile Thr Ile Thr Lys Ala
 100 105 110
 Asn Gly Glu Thr Ser Val Gly Tha Val Arg Ile Trp Asn Glu Tha Val
 115 120 125
 Ser Asn Leu Thr Leu Met Ala Leu Gly Ser Ser Ala Pro Glu Ile Leu
 130 135 140
 Leu Ser Val Ile Glu Val Cys Gly His Asn Phe Gln Ala Gly Glu Leu
 145 150 155 160

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Gly Pro Gly Thr Ile Val Gly Ser Ala Ala Phe Asn Met Phe Val Val
 165 170 175
 Ile Ala Val Cys Ile Tyr Val Ile Pro Ala Gly Glu Ser Arg Lys Ile
 180 185 190
 Lys His Leu Arg Val Phe Phe Val Thr Ala Ser Trp Ser Ile Phe Ala
 195 200 205
 Tyr Val Trp Leu Tyr Leu Ile Leu Ala Val Phe Ser Pro Gly Val Val
 210 215 220
 Gln Val Trp Glu Ala Leu Leu Thr Leu Val Phe Phe Pro Val Cys Val
 225 230 235 240
 Val Phe Ala Trp Met Ala Asp Lys Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Tyr Val
 245 250 255
 Tyr Lys Arg Tyr Arg Thr Asp Pro Arg Ser Gly Ile Ile Ile Gly Ala
 260 265 270
 Glu Gly Asp Pro Pro Lys Ser Ile Glu Leu Asp Gly Thr Phe Val Gly
 275 280 285
 Ala Glu Ala Pro Gly Glu Leu Gly Leu Gly Pro Gly Pro Ala Glu
 290 295 300
 Ala Arg Glu Leu Asp Ala Ser Arg Arg Glu Val Ile Gln Ile Leu Lys
 305 310 315 320
 Asp Leu Lys Gln Lys His Pro Asp Lys Asp Leu Glu Gln Leu Val Gly
 325 330 335
 Ile Ala Asn Tyr Tyr Ala Leu Leu His Gln Gln Lys Ser Arg Ala Phe
 340 345 350
 Tyr Arg Ile Gln Ala Thr Arg Leu Met Thr Gly Ala Gly Asn Val Leu
 355 360 365
 Arg Arg His Ala Ala Asp Ala Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Glu Gly
 370 375 380
 Ala Gly Glu Asp Glu Asp Gly Ala Ser Arg Ile Phe Phe Glu Pro
 385 390 395 400
 Ser Leu Tyr His Cys Leu Glu Asp Cys Gly Ser Val Leu Leu Ser Val
 405 410 415
 Thr Cys Gln Gly Gly Glu Gly Asn Ser Thr Phe Tyr Val Asp Tyr Arg
 420 425 430
 Thr Glu Asp Gly Ser Ala Lys Ala Gly Ser Asp Tyr Glu Tyr Ser Glu
 435 440 445
 Gly Thr Leu Val Phe Lys Pro Gly Glu Thr Gln Lys Glu Leu Arg Ile
 450 455 460
 Gly Ile Ile Asp Asp Asp Ile Phe Glu Glu Asp Glu His Phe Phe Val
 465 470 475 480
 Arg Leu Leu Asn Leu Arg Val Gly Asp Ala Gln Gly Met Phe Glu Pro
 485 490 495
 Asp Gly Gly Arg Pro Lys Gly Arg Leu Val Ala Pro Leu Leu Ala
 500 505 510
 Thr Val Thr Ile Leu Asp Asp His Ala Gly Ile Phe Ser Phe Gln
 515 520 525
 Asp Arg Leu Leu His Val Ser Glu Cys Met Gly Thr Val Asp Val Arg
 530 535 540
 Val Val Arg Ser Ser Gly Ala Arg Gly Thr Val Arg Leu Pro Tyr Arg
 545 550 555 560
 Thr Val Asp Gly Thr Ala Arg Gly Gly Val His Tyr Glu Asp Ala
 565 570 575
 Cys Gly Glu Leu Glu Phe Gly Asp Asp Glu Thr Met Lys Thr Leu Gln
 580 585 590
 Val Lys Ile Val Asp Asp Glu Glu Tyr Glu Lys Asp Asn Phe Phe
 595 600 605
 Ile Glu Leu Gly Gln Pro Gln Trp Leu Lys Arg Gly Ile Ser Ala Leu
 610 615 620
 Leu Leu Asn Gln Gly Asp Gly Asp Arg Lys Leu Thr Ala Glu Glu Glu
 625 630 635 640
 Glu Ala Arg Arg Ile Ala Glu Met Gly Lys Pro Val Leu Glu Asn

WO 03/037254

PCT/US02/34567

645	650	655
Cys Arg Leu Glu Val Ile Ile Glu Glu Ser Tyr Asp Phe Lys Asn Thr		
660	665	670
Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys Thr Asn Leu Ala Leu Val Ile Gly Thr		
675	680	685
His Ser Trp Arg Glu Gln Phe Leu Glu Ala Ile Thr Val Ser Ala Gly		
690	695	700
Asp Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ser Arg Glu Glu Arg Leu Pro Ser		
705	710	715
Cys Phe Asp Tyr Val Met His Phe Leu Thr Val Phe Trp Lys Val Leu		
720	725	730
Phe Ala Cys Val Pro Pro Thr Glu Tyr Cys His Gly Trp Ala Cys Phe		
740	745	750
Gly Val Ser Ile Leu Val Ile Gly Leu Leu Thr Ala Leu Ile Gly Asp		
755	760	765
Leu Ala Ser His Phe Gly Cys Thr Val Gly Leu Lys Asp Ser Val Asn		
770	775	780
Ala Val Val Phe Val Ala Leu Gly Thr Ser Ile Pro Asp Thr Phe Ala		
785	790	795
Ser Lys Val Ala Ala Leu Gln Asp Gln Cys Ala Asp Ala Ser Ile Gly		
805	810	815
Asn Val Thr Gly Ser Asn Ala Val Asn Val Phe Leu Gly Leu Gly Val		
820	825	830
Ala Trp Ser Val Ala Ala Val Tyr Trp Ala Val Gln Gly Arg Pro Phe		
835	840	845
Glu Val Arg Thr Gly Thr Leu Ala Phe Ser Val Thr Leu Phe Thr Val		
850	855	860
Phe Ala Phe Val Gly Ile Ala Val Leu Leu Tyr Arg Arg Arg Pro His		
865	870	875
Ile Gly Gly Glu Leu Gly Gly Pro Arg Gly Pro Lys Leu Ala Thr Thr		
885	890	895
Ala Leu Phe Leu Gly Leu Leu Trp Leu Leu Tyr Ile Leu Phe Ala Ser Leu		
900	905	910
Glu Ala Tyr Cys His Ile Arg Gly Phe		
915	920	

<210> 3
<211> 4282
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (94)...(2859)

<400> 3
ctctctcttc ttggggcgga gtcggccacc actgcccagcc cagcgctggg gggacacctgt 60
ccaggctgtt gccgcaggac cccaccaccc ccc atg gct ccc ctg gcc ttg gtg 114
Met Ala Pro Leu Ala Leu Val
1 5

ggg gtc aca ctc ctc ctg gcg gct ccc cca tgc tcc ggg gca gcc acc 162
Gly Val Thr Leu Leu Leu Ala Ala Pro Pro Cys Ser Gly Ala Ala Thr
10 15 20

cca acc ccc tcc ctg ccg cct ccc ccg gcc aat gac gcc gac acc agc 210
Pro Thr Pro Ser Leu Pro Pro Ala Asn Asp Ser Asp Thr Ser
25 30 35

aca ggg ggc tgc cag ggg tcc tac ccg tgc cag ccg ggg gtg ctg ctg 258

WO 03/037254

PCT/US02/34567

Thr Gly Gly Cys Gln Gly Ser Tyr Arg Cys Gln Pro Gly Val Leu Leu
 40 45 50 55

ccc gtg tgg gag ccc gac gac ccg tac ctg ggt gac aag ggc gca ccg 306
 Pro Val Trp Glu Pro Asp Asp Pro Ser Leu Gly Asp Lys Ala Ala Arg
 60 65 70

gca gtg gtg tac ttt gtg gcc atg gtc tac atg ttt ctg gga gtg tcc 354
 Ala Val Val Tyr Phe Val Ala Met Val Tyr Met Phe Leu Gly Val Ser
 75 80 85

atc atc gcc gac cgt ttc atg ggc gcc atc gag gtc atc acg tca aaa 402
 Ile Ile Ala Asp Arg Phe Met Ala Ala Ile Glu Val Ile Thr Ser Lys
 90 95 100

gag aag gag atc acc atc acc aag gcc aac ggt gag acc acg gtg ggc 450
 Glu Lys Glu Ile Thr Ile Thr Lys Ala Asn Gly Glu Thr Ser Val Gly
 105 110 115

acc gtt cgc atc tgg aat gag acg gtg tcc aac ctc acg ctc atg gcc 498
 Thr Val Arg Ile Trp Asn Glu Thr Val Ser Asn Leu Thr Ile Met Ala
 120 125 130 135

ctg ggc tcc tcc gca cct gag atc ctg ctg tca gtc atc gaa gtc tgc 546
 Leu Gly Ser Ser Ala Pro Glu Ile Leu Ser Val Ile Glu Val Cys
 140 145 150

ggc cac aac ttc cag ggc ggt gag ctg ggc cca ggc acc atc gtg ggc 594
 Gly His Asn Phe Gln Ala Gly Leu Gly Pro Gly Thr Ile Val Gly
 155 160 165

agc gct gcc ttc aac atg ttt gtg gtc atc gcc gtg tgc atc tac gtc 642
 Ser Ala Ala Phe Asn Met Phe Val Val Ile Ala Val Cys Ile Tyr Val
 170 175 180

atc cca gcc ggc gag agc cgc aag atc aag cac ctg aga gtc ttc ttt 690
 Ile Pro Ala Gly Glu Ser Arg Lys Ile Lys His Leu Arg Val Phe Phe
 185 190 195

gtc act gcc tct tgg agc atc ttc gcc tat gtc tgg ctt tat ctc atc 738
 Val Thr Ala Ser Trp Ser Ile Phe Ala Tyr Val Trp Leu Tyr Leu Ile
 200 205 210 215

ctt gct gtt ttt tcc ccc ggt gtg gtc cag gtg tgg gag ggc ctg ctg 786
 Leu Ala Val Phe Ser Pro Gly Val Val Gln Val Trp Glu Ala Leu Leu
 220 225 230

acc ctg gtc ttc ccc gtg tgc ttc gtc tgg atg gcc gac 834
 Thr Leu Val Phe Phe Pro Val Cys Val Val Phe Ala Trp Met Ala Asp
 235 240 245

aag cgg ctg ctc ttc tac aag tac gtg tac aag cgc tac cgc acc gac 882
 Lys Arg Leu Leu Phe Tyr Lys Tyr Val Tyr Lys Arg Tyr Arg Thr Asp
 250 255 260

cca cgc agc ggc atc atc ata ggc gcc gag ggc gac ccc ccg aag agc 930
 Pro Arg Ser GLY Ile Ile Gly Ala Glu Gly Asp Pro Pro Lys Ser
 265 270 275

atc gag ctg gac ggc acg ttc gtg ggc gcc gag cca ggt gag ctg 978
 Ile Glu Leu Asp Gly Thr Phe Val Gly Ala Glu Ala Pro Gly Glu Leu

WO 03/037254

PCT/US02/34567

280	285	290	295	
ggc ggc ctg ggc ccg ccc gcc gag ggc cgc gag ctg gac gcc agc				1026
Gly Gly Leu Gly Pro Gly Pro Ala Glu Ala Arg Glu Leu Asp Ala Ser				
300	305		310	
ggc cgc gag gtc atc cag atc ctc aag gac ctc aag cag aag cac ccg				1074
Arg Arg Glu Val Ile Glu Ile Leu Lys Asp Leu Lys Gln Lys His Pro				
315	320	325		
gac aag gat ctg gag cag ctg gtc ggc atc gcc aac tac tac gcg ctg				1122
Asp Lys Asp Leu Glu Gln Leu Val Gly Ile Ala Asn Tyr Tyr Ala Leu				
330	335	340		
ctg cac cag cag aag agc cgc gcc ttc tac cgc atc cag gcc acg cgg				1170
Leu His Gln Gln Lys Ser Arg Ala Phe Tyr Arg Ile Gln Ala Thr Arg				
345	350	355		
ctg atg acc ggc gcc ggg aac gtc ctg cgc aga cac gcg ggc gac gcc				1218
Leu Met Thr Gly Ala Gly Asn Val Leu Arg Arg His Ala Ala Asp Ala				
360	365	370	375	
tcg cgc agg gcg gcc ggc gag ggc ggc gag gac gaa gac gac				1266
Ser Arg Arg Ala Ala Pro Ala Glu Gly Ala Gly Glu Asp Glu Asp Asp				
380	385	390		
ggc gcc agc cgc atc ttc ttc gag cct agc ctc tac cac tgc ctg gag				1314
Gly Ala Ser Arg Ile Phe Phe Glu Pro Ser Leu Tyr His Cys Leu Glu				
395	400	405		
aac tgc ggc ttc ctg ctg tcc acg tgc cag ggc ggc gag ggc				1362
Asn Cys Gly Ser Val Leu Leu Ser Val Thr Cys Gln Gly Gly Glu Gly				
410	415	420		
sac agc acc ttc tac gtg gac tac cgc act gag gac ggc ttc aag				1410
Asn Ser Thr Phe Tyr Val Asp Tyr Arg Thr Glu Asp Gly Ser Ala Lys				
425	430	435		
gcg ggc tcc gac tac gac tac agc gag ggc acg ctg gtg ttc aaa cca				1458
Ala Gly Ser Asp Tyr Glu Tyr Ser Glu Gly Thr Leu Val Phe Lys Pro				
440	445	450	455	
ggc gag acg cag aag gag ctg cgc atc gcc atc atc gac gac gac atc				1506
Gly Glu Thr Glu Lys Glu Leu Arg Ile Gly Ile Ile Asp Asp Asp Ile				
460	465	470		
ttc gag gag gac cat ttc ttc gtg cgg ctg ctg aac ctg cgc gtg				1554
Phe Glu Glu Asp Glu His Phe Phe Val Arg Leu Leu Asn Leu Arg Val				
475	480	485		
ggc gac ggc cag ggc atg ttc gag cgg gag ggc ggc ggg cgg ccc aag				1602
Gly Asp Ala Gln Gly Met Phe Glu Pro Asp Gly Gly Arg Pro Lys				
490	495	500		
ggg cgg ctg gtg gcg ccg ctg gcc acc gtc acc atc ctg gac gac				1650
Gly Arg Leu Val Ala Pro Leu Leu Ala Thr Val Thr Ile Leu Asp Asp				
505	510	515		
gac cac gca ggc atc ttc ttc ttc cag gac cgc ctg ctg ccc gtg agc				1698
Asp His Ala Gly Ile Phe Ser Phe Gln Asp Arg Leu Leu His Val Ser				
520	525	530	535	

WO 03/037254

PCT/US02/34567

gag tgc atg ggc acc gtg gac gtc gtc cgc gtc cgc agc tcg ggc gcg 1746
 Glu Cys Met Gly Thr Val Asp Val Arg Val Val Arg Ser Ser Gly Ala
 540 545 550
 cgc ggc acc gtg cgc ctt ccc tac cgc acg gtg gac ggc acc cgg ccc 1794
 Arg Gly Thr Val Arg Leu Pro Tyr Arg Thr Val Asp Gly Thr Ala Arg
 555 560 565
 ggc ggc gtg cac tac gag gac ggc gtc gga gag ctg gag ttt ggc 1842
 Gly Gly Val His Tyr Glu Asp Ala Cys Gly Glu Leu Glu Phe Gly
 570 575 580
 gac gac gag acc atg aaa act ctt cag gtg aag ata gtt gat gag gag 1890
 Asp Asp Glu Thr Met Lys Thr Leu Glu Val Lys Ile Val Asp Asp Glu
 585 590 595
 gaa tat gag aaa aag gat aat ttc ttc att gag ctg ggc cag ccc cag 1938
 Glu Tyr Glu Lys Lys Asp Asn Phe Phe Ile Glu Leu Gly Gln Pro Gln
 600 605 610 615
 tgg ctt aag cga ggg att tca gct ctc aat caa ggg gat ggg 1986
 Trp Leu Lys Arg Gly Ile Ser Ala Leu Leu Leu Asn Gln Gly Asp Gly
 620 625 630
 gac agg aag cta aca gcc gag gag gag gct cgg agg ata gca gag 2034
 Asp Arg Lys Leu Thr Ala Glu Glu Glu Ala Arg Arg Ile Ala Glu
 635 640 645
 atg ggc aag cca gtt ctt ggg gag aac tgc cgg ctg gag gtc atc atc 2082
 Met Gly Lys Pro Val Leu Gly Glu Asn Cys Arg Leu Glu Val Ile Ile
 650 655 660
 gag gag tca tat gat ttt aag aac acc gtg gat aaa ctc atc aag aaa 2130
 Glu Glu Ser Tyr Asp Phe Lys Asn Thr Val Asp Lys Leu Ile Lys Lys
 665 670 675
 acg aac ttg gcc ttg gta att ggg acc cat tca tgg agg gag cag ttt 2178
 Thr Asn Leu Ala Leu Val Ile Gly Thr His Ser Trp Arg Glu Glu Phe
 680 685 690 695
 tta gag gca att acg gtg agc gca ggg gac gag gag gag gag gag 2226
 Leu Glu Ala Ile Thr Val Ser Ala Gly Asp Glu Glu Glu Glu Asp
 700 705 710
 ggg tcc cgg gag cgg ctg ccc tgc tgg ttc ttt gac tac gtg atg cac 2274
 Gly Ser Arg Glu Glu Arg Leu Pro Ser Cys Phe Asp Tyr Val Met His
 715 720 725
 ttc ctg acg gtg ttc tgg aag gtg ctc ttc gcc tgt gtg ccc ccc acc 2322
 Phe Leu Thr Val Phe Trp Lys Val Leu Phe Ala Cys Val Pro Pro Thr
 730 735 740
 gag tac tgc cac ggc tgg gcc tgc ttt ggt gtc tcc atc ctg gtc atc 2370
 Glu Tyr Cys His Gly Trp Ala Cys Phe Gly Val Ser Ile Leu Val Ile
 745 750 755
 ggc ctg ctc acc gcc ctc att ggg gac ctc gcc tcc cac ttc ggc tgc 2418
 Gly Leu Leu Thr Ala Leu Ile Gly Asp Leu Ala Ser His Phe Gly Cys
 760 765 770 775

WO 03/037254

PCT/US02/34567

cccaactacc cccataaactt tctgcttccc acaggttttc agcattctat cgtectgttg 4159
tgcgcagccc caacatccca gaccgttac cogtacccct tcttcctccc agctcatcat 4219
caagtgcgtt ctctttctg tgatttctgt aaaagttgcc ataaaacttt gaaattctgc 4279
ctg 4282

【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 03/037254 A3

(51) International Patent Classification: C12Q 1/68, A01N 43/04, C07H 21/04, A61K 31/07

(21) International Application Number: PCT/US02/34567

(22) International Filing Date: 28 October 2002 (28.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/335,078 31 October 2001 (31.10.2001) US

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

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): SILOS-SANTIAGO, Inmaculada (US/US); 180 Mass Hill Road, Jamaica Plain, MA 02130 (US).



(81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CII, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, IC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HK, 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 (utility model), SK, SL, TI, 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, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CI, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BH, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, MI, MR, NU, SN, TD, TG).

(Published:
with international search report)(88) Date of publication of the international search report:
21 August 2003

(74) Agent: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.; Legal-Intellectual Property (OBW-16), 75 Sidney Street, Cambridge, MA 02139 (US).

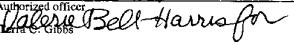
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/037254 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT AND DIAGNOSIS OF PAIN DISORDERS USING 46566

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions for the treatment and diagnosis of pain disorders, including, but not limited to, inflammatory pain, chronic pain and/or neuropathic pain. The invention further provides methods for identifying a compound capable of treating a pain disorder or modulating pain and/or inflammation response. The invention further provides a method for modulating pain and/or inflammation in a subject. In addition, the invention provides a method for treating a subject having a pain disorder characterized by aberrant 46566 polypeptide activity or aberrant 46566 allelic acid expression.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/34567												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12q 1/68, A01N 43/04; C07H 21/04; A61K 31/07 US CL : 536/23.1, 24.5, 24.3, 514/44, 2; 435/6, 325, 375, 91.1 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. : 536/23.1, 24.5, 24.3; 514/44, 2; 435/6, 325, 375, 91.1														
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) CaPlus, EmBase, Medline, WEST														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; width: 15%;">Category *</th> <th style="text-align: left; width: 60%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; width: 25%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>SHIMKETS et al. GenBank Sequence Accession No. AAC75706, N_Geneseq_101002 Database, October, 2000.</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KIKUNO et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Research, 1999 Vol. 6:197-205.</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LYTTON et al. K+ Dependent Na+/Ca2+ Exchangers in the Brain. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2002 Vol. 976:382-393.</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	SHIMKETS et al. GenBank Sequence Accession No. AAC75706, N_Geneseq_101002 Database, October, 2000.	1-13	A	KIKUNO et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Research, 1999 Vol. 6:197-205.	1-13	A	LYTTON et al. K+ Dependent Na+/Ca2+ Exchangers in the Brain. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2002 Vol. 976:382-393.	1-13
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	SHIMKETS et al. GenBank Sequence Accession No. AAC75706, N_Geneseq_101002 Database, October, 2000.	1-13												
A	KIKUNO et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XIV. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Research, 1999 Vol. 6:197-205.	1-13												
A	LYTTON et al. K+ Dependent Na+/Ca2+ Exchangers in the Brain. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2002 Vol. 976:382-393.	1-13												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on 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														
Date of the actual completion of the international search 27 February 2003 (27.02.2003)		Date of mailing of the international search report 28 APR 2003												
Name and mailing address of the ISA/US United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer  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 P 25/04	A 6 1 P 25/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/06	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 N 5/06	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	E
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 15/00	A
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N 0,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

(72)発明者 サイロス - サンティアゴ, インマクラーダ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 0 , ジャマイカ プレイン , モス ヒル ロード 1 8 0

F ターム(参考) 2G045 AA35 CB01 DA13 FB03 FB07
 4B024 AA01 AA11 CA01 CA12 HA12 HA17
 4B063 QA18 QQ53 QQ79 QQ91 QR32 QR48 QR55 QR77 QS24 QS32
 QX01
 4B065 AA90X AC20 BB40 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA13 AA17 AA25 BA44 DC50 NA14 ZA081 ZB011 ZB111
 ZC011 ZC411 ZC412
 4C085 AA13 AA21 BB11 CC03 DD62 EE01