

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506445

(P2004-506445A)

(43) 公表日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12	4 B O 6 3
A 6 1 P 5/24	A 6 1 P 5/24	4 C O 8 7
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 15/12	A 6 1 P 15/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 112 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-521521 (P2002-521521)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月16日 (2001.8.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月20日 (2003.2.20)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/009499
 (87) 国際公開番号 W02002/016426
 (87) 国際公開日 平成14年2月28日 (2002.2.28)
 (31) 優先権主張番号 00202905.6
 (32) 優先日 平成12年8月21日 (2000.8.21)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 01201771.1
 (32) 優先日 平成13年5月14日 (2001.5.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

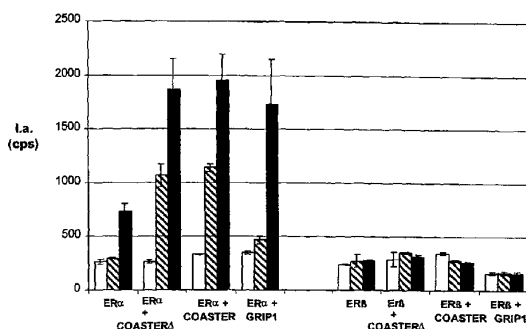
(71) 出願人 394010986
 アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
 オランダ国、6824・ベー・エム・アー
 ネム、フエルペルウエヒ・76
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100105131
 弁理士 井上 満
 (74) 代理人 100113332
 弁理士 一入 章夫
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100103920
 弁理士 大崎 勝真

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ステロイド受容体のヒトコアクチベーターCOASTER

(57) 【要約】

本発明は、配列番号7、8、11または12におけるアミノ酸配列を有するタンパク質、その類似タンパク質、天然に生じる変異体および相同機能的等価体、ならびにアッセイにおいて使用するための及び応答性核内受容体およびコアクチベーター（該コアクチベーターは前記タンパク質でありCOASTERと称され、該核内受容体は好ましくはステロイド受容体である）により促進される転写活性の調節方法において使用するためのそのようなタンパク質をコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- A) 配列番号 7、8、11 もしくは 12 におけるアミノ酸配列または配列番号 7 もしくは 8 におけるアミノ酸番号 1-234 の配列を有するタンパク質、
B) 配列番号 7、8、11 または 12 における配列に対して少なくとも 90% の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質、
C) 配列番号 7 または 8 におけるアミノ酸番号 1-234 の配列に対して少なくとも 90% の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質、
D) 配列番号 7、8、11 または 12 における配列を有するタンパク質の天然に生じる変異体であるタンパク質、
E) A、B、C または D で定義されるタンパク質の相同機能的等価体であるタンパク質よりなる群から選ばれることを特徴とするタンパク質。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、応答性核内受容体をも含む系内での発現に付す発現させることによる該ポリヌクレオチドの使用。

【請求項 3】

該タンパク質と該応答性核内受容体との結合に関するアッセイにおける、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

該応答性核内受容体がプロゲステゲン受容体、エストロゲン受容体またはグルココルチコイド受容体である、請求項 2 または 3 に記載の使用。

20

【請求項 5】

ポリヌクレオチドが導入され発現に付されしうる、応答性核内受容体を更に含むんでなる系であって、該ポリヌクレオチドが請求項 1 に記載のタンパク質をコードすることを特徴とする系。

【請求項 6】

系における応答性核内受容体およびコアクチベーターにより促進される転写活性の調節方法であって、該方法が該系への物質の添加を含んでなり、該物質が該コアクチベーターの機能を妨害または増強し、該コアクチベーターが請求項 1 に記載のタンパク質であることを特徴とする方法。

30

【請求項 7】

該方法が調節の度合の測定のためのインビトロアッセイであり、調節の度合を定量することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

該物質が該コアクチベーターの機能を妨害または増強する系がヒトまたは動物の体内の細胞である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

該応答性核内受容体がプロゲステゲン受容体、エストロゲン受容体またはグルココルチコイド受容体である、請求項 6 ~ 8 のいずれか 1 以上の項に記載の方法。

【請求項 10】

該コアクチベーターの機能を妨害または増強する物質を含むんでなる、請求項 8 に記載の方法において使用するための医薬組成物。

40

【請求項 11】

標識ポリヌクレオチドまたはその断片と RNA との定量的ハイブリダイゼーションに関して試験することを含むんでなる、応答性核内受容体関連疾患の診断方法であって、該ポリヌクレオチドが、配列番号 1、2、3、4、5、6、9 および 10 よりなる群からの配列の 1 以上に対して少なくとも 90% の相同性を有する配列を有することを特徴とする診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

本発明は、新規タンパク質、応答性核内受容体とコアクチベーターとの結合に関するアッセイ、および応答性核内受容体により促進される転写活性の調節方法に関する。

【0002】

本発明は、生物における核内受容体の機能の利用の分野におけるものである。核内受容体は広範な機能を有するが、それらの最も顕著な役割は、エストラジオール、コルチゾールおよびプロゲステロンのようなホルモンに対して細胞を応答させることにある。核内受容体を介して、該ホルモンは細胞内の遺伝子転写に影響を及ぼし、それにより該細胞はそれらの機能を変化させる。さらに、核内受容体による遺伝子転写の活性化は、コアクチベーターにより促進され又は更には可能となることが公知である。いくつかのそのようなコアクチベーターが公知である。例えば、Nishikawaら (Toxicol. Appl. Pharmacol. 154, pp 76-83, 1999) は、核内ホルモン受容体とコアクチベーターとの相互作用を利用するホルモン活性を有する化学物質に関するスクリーニング方法を記載している。それらの方法は、該コアクチベーターと核内受容体（これはその特定のコアクチベーターに対して応答性である）との相互作用が、該核内受容体に結合するリガンドにより安定化されうるという知見に基づくものである。また、そのようなアッセイは、一般に、ホルモンの作用および遺伝子の転写の制御メカニズムを解明するために重要である。これらの技術により、治療、診断、美容および避妊を目的として、特に核内受容体の機能に関連した生理的過程に影響を及ぼすための新規医薬を開発することが可能である。本発明は、配列番号7、8、11または12において与えられるアミノ酸配列を有するタンパク質を入手可能にする。そのようなタンパク質は、応答性核内受容体を、そのDNA転写促進機能において同時活性化（コアクチベート）する作用を有する。コアクチベーターとしてのそのようなタンパク質の機能の知見により、本発明はまた、ある系における応答性核内受容体およびコアクチベーターにより促進される転写活性の調節の新規方法であって、該方法が該系への物質の添加を含んでなり、該物質が本発明のコアクチベーターの機能を妨害または増強することを特徴とする方法を提供する。この方法は、該コアクチベーターの遺伝子を該系内に導入してそれを発現させることにより、ならびに該コアクチベーターおよび／または該コアクチベーター-核内受容体複合体の機能を変化させる化合物を同定し次いで使用することにより行うことができる。したがって、本発明における物質なる語は、例えば、化合物またはベクター（該ベクターは、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を含む）を意味する。そのような調節は、治療、避妊、診断および美容目的に核内転写過程を妨害または増強するために用いることが可能であり、それは、該調節の定量のためのアッセイにおいて使用することが可能である。したがって、系なる語は、分子のおよび／または生物学的に定められる環境を意味し、該調節物質が導入されうるインビトロ系およびインビボ系を意味する。インビトロ系は、DNAおよび／またはRNAの転写／翻訳を可能にする混合物であり、インビボ系は、細胞もしくは組織培養内またはヒトもしくは動物の体内に存在しうる細胞である。明らかに、核内受容体の活性の調節なる語は、該受容体の転写活性の増加または減少を意味し、一方、同時活性化なる語は、該受容体の転写活性の増強を意味する。

【0003】

そのようなタンパク質を表すと推定される配列は、EMBL/GenBank/DBJデータベースのアクセッション番号AB011148を参照することによりNagaseら (DNA Research vol 5, pp 31-39, 1998) による公開において遺伝子番号KIAA0576で既に報告されており、ここでは、それはタンパク質 Iid BAA25502に関連づけられている。遺伝子KIAA0576はRNA段階以降は発現されておらず、公知DNA配列に対する非常に弱い相同性（＜30%同一のヌクレオチド）からは、核酸マネジメント操作 (nucleic management) 以外のそれ以上の具体的な機能は推定されなかった。

【0004】

該タンパク質の配列における若干の修飾は前記用途に同等に有用であることが明らかであるため、本発明は、配列番号7、8、11または12における配列に対して少なくとも9

0%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の類似性を有するアミノ酸配列を有するタンパク質をも提供する。類似性なる語は、アミノ酸の相違を考慮した場合にはタンパク質間の類似性の度合を意味するが、その異なるアミノ酸は、ほとんど等しいサイズ、親油性、酸性度などを考慮すると、機能的に類似している。類似性(%)は、HenikoffおよびHenikoff(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 10915-10919 (1992))に記載のblosum62マトリックスのような類似性スコアリングマトリックスを使用する配列の最適アライメントにより計算することができる。blosum62類似性マトリックスとNeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970))のアルゴリズムとを使用する2つの配列の最適アライメントならびに類似性(%)の計算は、Genetics Computer Group(GCG, Madison, Wisconsin, USA)のGAPプログラムを該プログラムのデフォルトパラメーターを用いて使用して行うことが可能である。

10

20

30

40

50

【0005】

本発明のもう1つの態様は、前記の同時活性化機能が、配列番号7または8におけるアミノ酸番号1-234の配列を有するタンパク質によっても得られうることにある。トランケート化(短小化)タンパク質は、より大きなタンパク質と同じ又は部分的に同じ機能を有しうることが公知である。このトランケート化タンパク質も使用されうることが判明しており、したがって、本発明のこの態様は、配列番号7または8におけるアミノ酸番号1-234の配列に対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の類似性を有する配列を有するタンパク質をも提供する。

【0006】

配列番号7、8、11または12における配列を有するタンパク質の天然に生じる変異体であるタンパク質を提供することが、本発明のもう1つの態様である。配列番号7、8、11または12において定義されるタンパク質に対して少なくとも80%の類似性、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、より一層好ましくは少なくとも99%、最も好ましくは100%の類似性を有するアミノ酸配列を有しヒト組織または非ヒト種の組織に由来するタンパク質も、応答性核内受容体を同時活性化するために同様に使用することができる。そのような多型形態および種ホモログも、本発明により入手可能となったタンパク質のクラスに含まれる。配列番号7、8、11または12により定義されるタンパク質の示されている構造および機能における共通の性質により定義されるクラスに属する天然に存在するタンパク質を、任意の文字の並びで、COASTERタンパク質と称することとする。初期の文書、少なくとも、本発明者らの研究組織内で頒布された文書においては、本発明のタンパク質に名称を与えるために、任意の文字の並びであるMFCが使用されている。したがって、MFCおよびCOASTERは同義語である。他のCOASTER断片も生物学的組織において見出される。そのような断片はスプライス変異体にコードされる。

【0007】

さらに、該タンパク質の構造およびCOASTERタンパク質の機能を開示して、本発明は、前記タンパク質の相同機能的等価体であるタンパク質をも提供する。相同機能的等価体は、前記で示した割合の1つより低い類似性を有するため又は前記で定義されているとよりの断片ではないため又は非天然由来であるため既に定義されている特性を完全には満足しないが、本発明の既に定義されているタンパク質と共通の特徴的機能を尚も有するタンパク質である。例えば、COASTERタンパク質の断片は、応答性核内受容体の同時活性化のために単独で使用されるだけでなく、該核内受容体活性化作用を利用するために、他のタンパク質から知られた他のタンパク質配列と融合されることも可能である。そのような断片は無傷インタクトなCOASTERタンパク質の断片の配列と100%同一である必要はない。さらに、COASTERタンパク質およびそのスプライス変異体と機能的に等価なタンパク質を、コードするポリヌクレオチド配列における意図的な突然変異、

挿入または欠失により人工的に製造することができる。本明細書中に詳細に特徴づけられているタンパク質と或るタンパク質との高度の類似性は、タンパク質をC O A S T E Rタンパク質と機能的に等価なものとする。本明細書においては、本発明のタンパク質は、任意の前記のとおり、いかなる構造的に類似した又は機能的に等価な人工タンパク質、スプライス変異体またはC O A S T E Rタンパク質（前記の定義のとおり）を意味する。

【0008】

該タンパク質の有用性を考慮すると、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを、応答性核内受容体をも含む系内で発現させることによる、該ポリヌクレオチドの使用を提供することが、本発明の1つの態様である。DNAヌクレオチド配列およびRNA配列の両方が、本発明のタンパク質をコードする目的を果たすため、該ポリヌクレオチドはDNAまたはRNAでありうる。本発明での使用のための好ましいDNAは、配列番号1、2、3、4、5、6、9または10において与えられる配列である。当技術分野で一般に公知の方法により、真核細胞、細菌、プラスミドまたはベクター内に該ポリヌクレオチドを人工的に導入し、該遺伝子の転写を可能にすることにより、発現を得ることができる。本発明のタンパク質と該核内受容体との相互作用を利用することが可能となるためには、DNAまたはRNAの転写および／または翻訳のための成分あるいは無傷インタクトな細胞（おそらくは全生物の一部）（おそらくは全生物の一部）との混合物でありうる系は該応答性核内受容体をも含有する又は生成すべきである。これらの技術に関する実用的な情報源は、Sambrookら、Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989において見出されうる。

【0009】

ヌクレオチドの場合、同じアミノ酸をコードするヌクレオチドトリプレットで前記配列中のトリプレットが置換されうることによる類似性の度合に言及されることがある。より一般的には、ヌクレオチドの相同配列に言及される。

【0010】

ポリヌクレオチドの相同性は、該配列の最適アライメントの後、以下のとおりに定められる。

【0011】

【数1】

2つの配列間の同一残基の数

相同性(%)

整列した配列の長さ－全ギャップの長さ

【0012】

最適アライメントは、マッチの数を最大にしギャップの数を最小にするNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) のアルゴリズムを使用して行うことができる。実際には、類似性なる語を、ポリヌクレオチドの相同性に対しての類似した定義を有する相同性に置き換えることにより、より限定された範囲のタンパク質を定義することが可能である。本発明のタンパク質に関する相同性なる語の前記のようなそのような使用は、該タンパク質中のアミノ酸残基の同一性(%)に基づく。あるいはまた、このようにして定義されるタンパク質の相同性の度合なる語の代わりに、タンパク質の同一性の度合なる語を用いることが可能である。

【0013】

コドン可変性に適応させるために、本発明はまた、本明細書に開示する配列と同じアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を含む。本明細書に提供する配列情報は、誤って同定された塩基の排除を要するほどに狭く解釈されるべきではない。本明細書に開示す

る具体的な配列は、いくつかの他の種または対立遺伝子変異体の完全な遺伝子を単離するために容易に使用することが可能である。該配列は、例えば、プローブを製造するために、または完全な変異体遺伝子の単離および同定を可能にするDNA増幅反応におけるプライマーとして使用される合成オリゴヌクレオチドを製造するためのソース起源として使用することができる。完全な遺伝子配列は、適当な宿主細胞内での該タンパク質の発現のためのベクター分子の製造において使用することができる。

【0014】

本発明は更に、若干の変異を有する又は多型部位を有するポリヌクレオチドに関する。若干の変異を有するポリヌクレオチドは、天然成熟タンパク質と同じ生物学的機能を保有する変異体ポリペプチドをコードしうる。多型部位は診断目的に有用である。

10

【0015】

もう1つの態様においては、本発明は、a) 本発明のDNAを、好ましくは関心のあるポリヌクレオチドを高度に発現する組織から単離されたRNA、(ゲノム) DNAまたはcDNAである核酸に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせ、b) 当業者に公知の方法により該核酸を単離する工程を含んでなる、ポリヌクレオチドの単離方法を提供する。該組織は、好ましくはヒト由来である。好ましくは、リボ核酸は、卵母細胞、卵巣または精巣から単離される。該ハイブリダイゼーション条件は、好ましくは、高度にストリンジェントである。

【0016】

本発明において、「ストリンジェント」なる語は、65℃の温度で1×SSC、0.1% SDSの洗浄条件を意味し、高度にストリンジェントな条件は、0.3×SSC、より好ましくは0.1×SSCまでのSSCの減少を意味する。好ましくは、最初の2回の洗浄を、それぞれ15～30分間にわたり続けて2回行う。高度にストリンジェントな条件下で洗浄する必要がある場合には、0.1×SSCでの追加的な洗浄を15分間にわたり1回行う。ハイブリダイゼーションは、例えば、0.5M リン酸バッファー(pH 7.5) / 7% SDS中、65℃で一晩にわたり行うことができる。

20

【0017】

代替手段として、該遺伝子の単離方法は、本発明の核酸に由来するプライマーを使用する遺伝子増幅法を含みうる。また、例えばハイブリダイゼーションにより得たクローンを、例えばRACE cDNAクローンと組合せることにより、完全なcDNAを得ることが可能である。

30

【0018】

転写の調節を利用するためには、該系はまた、応答性核内受容体の遺伝子およびこれらの核内受容体の応答性プロモーター要素を含むべきである。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、組換え核内受容体タンパク質と共に、該タンパク質と該応答性核内受容体との結合に関するアッセイにおいて使用する組換えCOASTERタンパク質の製造に使用することができる。

【0019】

応答性核内受容体なる語は、本明細書においては、COASTERタンパク質により活性化されうるいかなる任意の核内受容体を意味するものとして用いられている。好ましくは、該アッセイの系内の核内受容体は、ステロイド受容体、より好ましくはプロゲステゲン受容体、エストロゲン受容体またはグルココルチコイド受容体である。応答性核内受容体および本発明のコアクチベーターにより促進される転写活性の調節の方法は、調節の度合を測定するためのインビトロアッセイであることが可能であり、調節の度合を定量することを含む。調節または結合の度合の定量の手段は、本明細書に記載されているような酵母ツーハイブリッドアッセイまたは哺乳類細胞系内での同様のツーハイブリッドアッセイを含みうる。あるいは、結合効率の検出を可能にするために適切に標識された核内受容体およびCOASTERの単離された組換えタンパク質を使用して、結合効率を測定することができる。該タンパク質の標識では、該組換えタンパク質に直接的または間接的に結合した放射能もしくは蛍光分子または酵素特性を有する分子を使用することが可能である。あ

40

50

るいは、B I A C O R Eのようなアフィニティーに基づくバイオセンサーシステム系により、結合効率を測定することができる。あるいは、 β -ガラクトシダーゼまたはジヒドロ葉酸レダクターゼのような機能的タンパク質の相補を駆動する、C O A S T E Rタンパク質と該核内受容体との相互作用を用いるインビトロまたはインビボ相補アッセイにより、結合効率を測定することが可能であり、これにより、該相補タンパク質の機能が該結合効率の尺度として利用される。

【0020】

また、応答性核内受容体および本発明のコアクチベーターにより促進される転写活性の調節の方法は、ヒトまたは動物への該物質の投与を含む該ヒトまたは動物の身体の治療処理でありうる。そのような物質は、該核内受容体の活性化のための、より多量のコアクチベーターの産生を可能にするよう、該コアクチベーターの遺伝子を該生物の細胞内に導入するベクターでありうる。あるいは、それは、内因性C O A S T E Rタンパク質の作用を妨げる本発明のタンパク質の産生を可能にして該核内受容体の作用の減弱を引き起こすよう、該生物の細胞内に欠損コアクチベーターの遺伝子を導入するベクターでありうる。該物質はまた、該コアクチベーターと該応答性核内受容体との相互作用に影響を及ぼす化学的化合物でありうる。そのような化合物は、該コアクチベーターと該応答性核内受容体との結合に関するアッセイにおける又は該応答性核内受容体の作用の調節の定量のためのアッセイにおける通常のスクリーニングにより得ることができる。したがって、C O A S T E Rタンパク質と応答性核内受容体との結合を調節する化合物または核内受容体-C O A S T E R複合体の活性を調節する化合物を選択するために本発明のアッセイまたは方法を使用しうることは、本発明のもう1つの態様である。そのようなアッセイにおいては、化合物は、それらがC O A S T E Rと応答性核内受容体との相互作用を誘発または妨げる能力に関して、またはそれらが応答性核内受容体を介して若しくはC O A S T E RおよびレポーターDNAの存在下で転写を調節する能力に関して試験される。レポーターDNAは、研究中の核内受容体に応答性であるプロモーター、および転写活性がモニターされうるレポーター遺伝子よりなる。該プロモーターは、核内受容体応答性遺伝子の単離された天然プロモーター、または基礎コアプロモーター（例えば、T A T Aボックス）に融合したコンセンサス核内受容体応答性要素の（多数のコピーの）合成カセット（多数コピーの）でありうる。適当なレポーター遺伝子には、酵素アッセイにより活性がモニターされうる酵素（例えば、ルシフェラーゼまたは β -ガラクトシダーゼ）をコードする遺伝子、蛍光特性を有するタンパク質（例えば、グリーン蛍光タンパク質）をコードする遺伝子、または転写産物のレベルがモニターされうる遺伝子が含まれる。

【0021】

C O A S T E Rは、エストロゲン受容体 α および半部分アゴニストの存在下でエストロゲン受容体応答性要素（E R E）含有プロモーターの作用を増強し、それにより新規半部分アゴニストの同定を可能にするため、後者のアッセイが特に有利である。公知のE R Eに基づくアッセイは、すべての半部分アゴニスト（例えば、ラロキシフェン）を認識しうるわけではない。

【0022】

本発明はまた、物質（該物質は本発明のコアクチベーターの機能を妨害または増強する）をヒトまたは動物の体内に投与することを含む或る系における、応答性核内受容体およびコアクチベーターにより促進される転写活性の、前記調節方法のための医薬としての医薬組成物を提供する。本発明はまた、該コアクチベーターの機能を妨害または増強する物質を含む、前記における使用のための医薬組成物を提供する。前記のとおり、本発明により提供されるアッセイで同定された化合物は、本発明のタンパク質のコアクチベーターとしての機能を妨害または増強しうる。あるいは、本発明のタンパク質の遺伝子を含むベクターを、医薬用途のために製剤化することができる。

【0023】

該物質を1以上の医薬上許容される佐補助剤〔例えば、標準的な参考書であるG e n n a r o r a, R e m m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 50

、(第18版, Mack publishing Company, 1990、特に、Part 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufactureを参照されたい)に記載されているもの]と混合することによる医薬の製造方法は、当技術分野においてよく知られている。適当な補助佐剤は、例えば、Handbook of Pharmaceutical Excipients (第2版, A. WadeおよびP. J. Weller編; American Pharmaceutical Association; Washington; The Pharmaceutical Press; London, 1994)に記載されている。該物質と医薬上許容される補助佐剤との混合物は、丸剤、錠剤のような固形投与単位に圧縮したり、あるいはカプセル剤または坐剤に加工することができる。また、医薬上適した液体を使用することにより、該物質を、溶液、懸濁液またはエマルションの形態の注射剤として、あるいは噴霧剤、例えば鼻腔内噴霧剤として適用することができる。投与単位(例えば、錠剤)の製造の場合には、通常の添加剤、例えば充填剤、着色剤、高分子結合剤などが意図される。

【0024】

そのような医薬組成物は、COASTER活性化核内受容体関連治療において、より詳しくは、ホルモン刺激腫瘍増殖に対して、男性または女性の避妊のために、女性における更年期閉経愁訴および更年期閉経後障害の治療のために、同化促進性薬物治療のために、心臓病に対して、ならびに減少したホルモン活性による老化の治療のために使用することができる。COASTERタンパク質は組織特異的発現プロファイルを示すため、そのような医薬は組織特異的治療に貢献しうる。さらに、COASTERの存在または調節は、核内受容体リガンドの薬理学的特性を改変しうる。例えば、ラロキシフェンは、通常はアンタゴニストであるが、COASTERが細胞内で明らかに発現されている場合には、ラロキシフェンはアゴニスト特性を示す。

【0025】

また、本発明のタンパク質またはその断片をコードする配列を有する適切に標識されたポリヌクレオチドも、本発明により入手可能となる。これらは、生物におけるCOASTER-RNAの異常な発現に関連した疾患を同定するためにRNAのストリンジェントな定量的ハイブリダイゼーションによる診断方法において使用することができる。ハイブリダイゼーションでRNAの正確な同定を行うためには、これらの方法は、少なくとも500ヌクレオチド長を有するそのような標識ポリヌクレオチドの使用を伴うのが有利でありうる。しかし、より実用的であり尚もこの目的に有効であるためには、20~50ヌクレオチド長も好ましい。診断目的には、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)のようなヌクレオチド鎖反応により、COASTER mRNAの発現を検出することも可能である。この目的には、逆転写酵素を使用して、サンプル試料から単離されたRNAからcDNAを合成する。ついでCOASTERアンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチドプライマーの存在下、該cDNAをポリメラーゼ連鎖反応において鋳型として使用する。適当な検出方法と組合された同位体もしくは非同位体標識により又は直接分光光度もしくは比色法により測定されうる増幅されたPCR産物の量は、COASTER mRNAの相対発現レベルを表す。

【0026】

標識は種々の方法で行うことができる。放射能標識の場合には、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、該放射能標識ハイブリッドの1秒当たりのデスインテグレーション(desintegration)の数の定量により測定することができる。あるいは、ハイブリダイズした放射能標識断片は、オートラジオグラフィーまたは同様の方法により可視化することができる。非同位体標識法は、しばしば、該断片の標識中に取り込まれるビオチン化ヌクレオチドを使用する。ついで、成功裏にハイブリダイズした断片を、取り込まれたビオチンに基づき検出することができる。該ビオチン部分は、蛍光または酵素特性を有する分子に共役したアビジン分子を使用して検出することができる。蛍光または酵素活性の量を、該ハイブリダイゼーション効率の尺度として用いる。該診断方法は、腫

瘍増殖を伴う疾患に特に有用であろう。COASTER遺伝子は腫瘍細胞系内で強く発現されることが顕著である。該診断方法は、診断する生物からの生検の実施またはスキャンにより行うことができるが、該方法は、ヒトまたは動物の身体上では実施されない方法に厳密に限定されうる。そのような場合、該方法は、ハイブリダイゼーションのための入手可能な生物学的材料のインビトロ試験を含む。COASTERに対する核内受容体の感受性を考慮して、該方法は、好ましくは、疑われる疾患がステロイド受容体、より好ましくはプロゲステロン受容体、エストロゲン受容体またはグルココルチコイド受容体の機能不全に関連している場合に用いられる。

【0027】

また、本発明のためのタンパク質は、これらのタンパク質に対する抗体を製造するために使用することが可能であり、該抗体は、本発明に開示する同時活性化過程における変化を伴う障害の診断方法において使用することができる。モノクローナルおよびポリクローナル抗体の製造方法は、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl 編, John Wiley & Sons Inc.) のような標準的な実験マニュアルに記載されている。免疫は、COASTERタンパク質の粗製もしくは精製調製物を使用して、または抗体ドナー生物を免疫するために直接使用されるCOASTERの哺乳類発現ベクターを使用するDNAワクチン接種により行うことができる。

【0028】

COASTERタンパク質および真核細胞、細菌、プラスミドまたはベクター内に人工的に取り込まれるCOASTERをコードするポリヌクレオチドは、ヒト精巣からのRNAの逆転写により得たcDNA鋳型上でのポリメラーゼ連鎖反応による増幅により得ることができる。該ポリメラーゼ連鎖反応は、COASTER cDNAの開始コドンを含むセンスプライマー（例えば、ATGGGAGACCCGGGGTCGGA；配列番号13）、およびCOASTER cDNAの終結コドンを含むアンチセンスプライマー（例えば、TTACATTTCTCAAGACTTC；配列番号14）を利用すべきである。適当な発現ベクターにおけるこのようにして得られたcDNAのクローニングは、COASTERタンパク質の産生を可能にする。ヌクレオチドの欠失および挿入により、部分的に同一である人工COASTERタンパク質を、例えばSambrook（前掲）に記載の当業者によく知られた方法により得ることができる。COASTERタンパク質は、COASTER cDNAを含有する発現ベクターのトランスフェクションにより生物内に導入することができる。該ベクターは、トランスフェクトされた生物において遺伝子発現を駆動しうるプロモーターと、このプロモーターの下流のCOASTER cDNAとを含有すべきである。また、該ベクターは、転写および翻訳の適切な開始および終結のためのシグナルと、該転写産物の適切なプロセシングのためのシグナルとを含有すべきである。哺乳類細胞内へのCOASTERの導入のためには、ウイルスプロモーター、例えば、シミアンウイルス40、ラウス肉腫長末端反復配列またはサイトメガロウイルス最初期プロモーターが、COASTER cDNAの転写の駆動に適している。ウイルスプロモーターを含有するプラスミドベクターの具体例には、pCDNA3.1、pRSVおよびpNGV1が含まれる。プラスミドを介した哺乳類細胞内へのCOASTERの導入に加えて、COASTERの運搬および発現のためのウイルスベヒクルを使用するトランスダクションにより、COASTERを哺乳類細胞内に導入することが可能である。適当なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルスおよびバキュロウイルスが含まれる。細菌細胞内へのCOASTERの導入のためには、T7プロモーターのような細菌プロモーターを含有するベクターが適している。細菌発現ベクターの具体例には、pRSETおよびpETが含まれる。酵母内へのCOASTERの導入のためには、適当なベクターには、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）内への導入のためのpYES、およびピチア・パストリス（*Pichia pastoris*）内への導入のためのpPICが含まれる。

【0029】

該アッセイのための応答性核内受容体を選択するためには、直接的な方法が利用可能である。例えば、核内受容体が一過性トランスフェクションアッセイにおいてよってCOASTERTタンパク質により同時活性化されるか否かについて試験することができる。同時活性化が存在する場合には、該核内受容体は応答性である。核内受容体の作用は、プロモーターの下流に連結した遺伝子の転写の誘発である。例えば、ツーハイブリッドアッセイにより、該核内受容体がCOASTERTタンパク質と相互作用するか否かを試験することができる。同様に、人工タンパク質のCOASTERTタンパク質の機能的等価体を、実施例に記載のアッセイにおいて常套的に試験することができる。

【0030】

本発明の変異体および用途の以下の説明は、本発明およびその使用を更に実施可能なものとすることを意図している。

【0031】

選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) にリガンド化されたER α の同時活性化はAF1領域に依存する

図4は、COASTERTが、4OH-タモキシフェンでリガンド化 (liganded) されたER α のコアクチベーターであるが、4OH-タモキシフェンでリガンド化されたER β のコアクチベーターではないことを示している。これらの結果は、SERM 4OH-タモキシフェンがAF1機能を介してシグナリングするという従来の観察と良く符合する。該AF1機能はER α のABドメイン内にはあるが、ER β においては構造的にも機能的にも保存されていない (McInerneyら, 1998, Endocrinology 139, 4513-4522)。この見解を立証するために、本発明者らは、2つの受容体キメラ上でCOASTERTの同時活性化能を試験した。既に記載されているとおり (McInerneyら, 1998, Endocrinology 139, 4513-4522)、ER β / α キメラは、ER α のCDEFドメインに融合したER β のABドメインを含有する。トランスフェクション実験においては、該ER β / α 受容体は、17 β -エストラジールの存在下では、COASTERTにより同時活性化を可能にするが、SERM 4OH-タモキシフェンおよびラロキシフェンの存在下では、それを可能にしない (図8)。この観察は、SERMによりリガンド化された受容体のCOASTERTによる同時活性化が、17 β -エストラジールによりリガンド化された受容体の同時活性化とは異なることを示している。4OH-タモキシフェンによるシグナリングがER α AF1を必要とするという従来の観察と一致して、本発明者らの結果は、4OH-タモキシフェンがER β / α キメラ上で作動性を示さないことを示している。さらに、本発明者らのデータは、該細胞内のCOASTERTレベルの上昇が活性におけるこの遮断に打ち勝たないことを示しており、このことは、SERMによりリガンド化された受容体の同時活性化がER α AF1を必要とすることを示している。ER β のCDEFドメインに融合したER α AF1を含有するER α / β キメラ上での状況は、より複雑である。ER α / β キメラは、野生型ER α またはER β 受容体の場合と比較して減少した17 β -エストラジールの存在下での活性および4OH-タモキシフェンの作動性を示すことが、既に示されている (McInerneyら, 1998, Endocrinology 139, 4513-4522)。本発明者らのデータは、これらの結果を証明し拡張するものであり、4OH-タモキシフェンおよび17 β -エストラジールに加えて、ラロキシフェンもER α / β キメラを介してシグナリングしうることを示している。しかし、ER α / β キメラはCOASTERTによる同時活性化に対して不感受性である。組合された結果は、ER α / β キメラが特有のコンホメーションを取ることを示しており、17 β -エストラジールによりリガンド化された野生型ER β 上で見出されるとおりの同時活性化が、AF2機能および配列 (ER β のN末端のもの) の両方に左右されることを示唆している。

【0032】

COASTERTは新規SERMを同定する

10

20

30

40

50

COASTERの不存在下、4OH-タモキシフェンはER α 上でアゴニストとして機能しうるが、ラロキシフェンはそのように機能し得ないことを、図4および5に示す結果は示している。該細胞内のCOASTERレベルの上昇は、作動能を有するリガンドとしてのラロキシフェンの同定を可能にする。本発明者らは、COASTERが、抗エストロゲン剤として既に同定されている化合物のプール中の新規潜在的SERMの同定を可能にするか否かを問うた。この目的のために、本発明者らは、新規抗エストロゲン剤として同定された化合物ORG43143、ORG39660およびORG39669の活性をハイスループットスクリーニングアッセイ (Decheringら, 2000, Current Medicinal Chemistry 7, 561-576に記載の方法) において試験した。図9は、これらの化合物がすべて、抗エストロゲン剤として挙動すること
10
を示している。注目すべきことに、化合物ORG39669は抗エストロゲンアッセイにおいて部分活性を示している。COASTER同時活性化アッセイにおいて試験した場合、この群の抗エストロゲン剤は、3つの異なる機能的クラスに分類される (図10)。第1のクラスは4OH-タモキシフェンおよびORG39669を含み、ER α 上で何らかの作動性を示しCOASTERの存在下で作動性を増強した化合物の一群を代表する。第2のクラスは、COASTERの不存在下でEREレポーターのER α 媒介転写に対して不活性 (サイレント) な抗エストロゲンの一群である。しかし、COASTERレベルが
20
上昇すると、これらの化合物はアゴニストとなる。化合物ラロキシフェンおよび新規抗エストロゲンORG43143は、この第2のクラスの代表例である。最後のクラスの抗エストロゲン剤はICI 164, 384およびORG39660を含み、ERE受容体上
20
で作動性を示さずCOASTERの存在下で不活性 (サイレント) なままである化合物の一群を代表する。

【0033】

COASTERの組織分布

COASTER mRNAの組織分布をノーザンブロット分析およびRT-PCRにより調べた。ヒト多組織ノーザンブロットを794bpのCOASTER cDNA断片とハイブリダイズさせた。調べたほとんどすべての組織が約5kBのサイズのmRNA種に対するハイブリダイゼーションを示しており、精巣、卵巣、心臓、胎盤および骨格筋においては、より高いシグナルが示され、その他の組織においては、より低いシグナルが示されるか又は全くシグナルが示されなかった (図6)。さらに、精巣内に特有に存在する4kB
30
の転写産物に対して、非常に強力なハイブリダイゼーションシグナルが観察される。5kBの転写産物のサイズは、本発明者らが単離しているcDNAのサイズと良く合致する。4kBの転写産物はスプライス変異体に相当しうる。この転写産物の精巣特異的発現パターンは顕著であり、精巣の生理学における機能的役割を示唆している。また、腫瘍に由来する種々のヒト細胞系において並びにヒトおよびマカク・ファスシキュラタ (Macaca fasciculata) (シノモルグスザル) 組織からのRNAサンプルにおいて、RT-PCR分析により、COASTERからのmRNAの発現を調べた。該RT-PCRの半定量的結果を図7および11に示す。該結果は、乳上皮癌細胞系MCF-7およびT-47ならびに膈上皮細胞系SW954において高い発現を示している。骨肉腫細胞系U-2 OSおよびHOS、子宮内膜上皮癌細胞系Ishikawa、血管内皮細胞
40
系VE103ER α ならびに内皮細胞系HS760Tにおいては、中等度の発現が観察された。骨肉腫細胞系MG63および子宮内膜上皮癌細胞系ECC-1においては、発現は検出されなかった。COASTERの高い発現を示す細胞系 (MCF-7、T47D、SW954) は高レベルのER α を含有することが報告されており (Decheringら, Curr. Med. Chem. 7, 561-576)、このことは、COASTERが腫瘍細胞のER α 媒介増殖に寄与しうることを示唆している。組織由来のRNA上でのRT-PCRの結果を図11に示す。RT-PCR法は、ノーザンブロット (図6) により示されたとおりの精巣内での高い発現を証明している。また、骨組織において、高い発現が認められる。これは、核内受容体-COASTER相互作用を可能にするリガンドが骨代謝に影響を及ぼしうることを示している。

【0034】

さらに、実施例および図面により、本発明を例示し明瞭化または特定することとする。以下の図面により、説明を例示する。

【0035】

図1. COASTERのヌクレオチドおよびアミノ酸配列の具体例

このCOASTER cDNA配列は、3039塩基対（1013アミノ酸）のオープンリーディングフレームを有する4999塩基対の長さを有する。ほぼ完全な相同性（99%）を有するKIAA0576をコードするcDNAの既に公開されている配列（アクセッション番号AB011148）は、1061アミノ酸のオープンリーディングフレームを与える2832位における144ヌクレオチドの挿入を示す。ジंकフィンガーモチーフが太字で示されており、LXXLLモチーフが下線で示されている。コンセンサス核局在化シグナルのアミノ酸配列が、下線付きのイタリック体で示されている。ATG開始コドンおよびインフレーム翻訳終結コドンが太字のイタリック体で示されている。

10

【0036】

図2. 該COASTER cDNA配列は約115キロダルトンのタンパク質をコードしている。COASTERの完全なオープンリーディングフレームを含有する鑄型pCDNA3.1.HISC.COASTERを、インビトロで転写し翻訳した（ $[^3\text{S}]$ ーメチオニンの存在下）。対照として、平行して、pBKR-SRC-1（Onateら, Science 270, 1354-1357）を転写し翻訳した。標識タンパク質をSDS-PAGEにより分析した。この図は、電気泳動パターン of のオートラジオグラフを示す。レーン1: pBKR-SRC-1の翻訳産物。レーン2: pCDNA3.1.HISC.COASTERの翻訳産物。COASTERタンパク質の位置が矢印で示されている。

20

【0037】

図3. ER β とCOASTERとの間のホルモン依存性相互作用。プラスミドpGBT9.ER β 、およびGAL4活性化ドメインとCOASTERアミノ酸1-234との融合体をコードするプラスミドで形質転換された酵母宿主株AH109において、酵母ツーハイブリッドアッセイを行った。この図は、 10^{-8}M 17 β -エストラジオール（陰影付き斜線の棒線）および 10^{-5}M ラロキシフェン（黒塗りの棒線）に応答した該形質転換酵母細胞の β -ガラクトシダーゼ活性を示す。該形質転換酵母細胞のバックグラウンド β -ガラクトシダーゼ活性が白抜きの棒線で示されている。

30

【0038】

図4. 4OH-タモキシフェンおよびラロキシフェンに応答したER α およびER β の差次的（differential）同時活性化。U-2 OS細胞を、示されているとおりにp4ERE-TATA-LUCおよびpNGV1.ER α またはpNGV1.ER β で一過性にトランスフェクトした。示されている場合には、細胞をCOASTER発現構築物pCDNA3.1HISA.COASTER Δ もしくはpCDNA3.1HISC.COASTERまたは発現構築物pCDNA3.1HISC.GRIP1でコトランスフェクトした。この図は、ホルモンの不存在下（白抜きの棒線）または 10^{-7}M ラロキシフェン（陰影付き斜線の棒線）もしくは 10^{-7}M 4OH-タモキシフェン（黒塗りの棒線）の存在下で該細胞をインキュベートした後のルシフェラーゼ活性（l. a.）を示す。誤差線は三重の実験における標準偏差を示す。

40

【0039】

図5. ER α の存在下またはCOASTERと組合されたER α の存在下でのエストロゲン応答性エレメントの用量依存的活性化。U-2 OS細胞をp4ERE-TATA-LUCおよびpNGV1.ER α で一過性にトランスフェクトした。黒塗りの記号で示されたトランスフェクション実験はCOASTER発現構築物pCDNA3.1HISC.COASTERで補足された。この図は、漸増濃度のラロキシフェン（正方形で示されている）または4OH-タモキシフェン（三角形で示されている）と共に該細胞をインキュベートした後のルシフェラーゼ活性（l. a.）を示す。誤差線は三重の実験における標準偏差を示す。

50

【0040】

図6. COASTER転写産物の組織分布。ヒト多組織ノーザンブロットを $[^3\text{ }^2\text{ P}]$ 標識COASTER cDNAプローブとハイブリダイズさせた。この図は該ブロットのオートラジオグラフを示す。該COASTERプローブは、矢印で示されている約5 k Bおよび4 k Bのサイズの2つのmRNA種にハイブリダイズしている。該ブロット上に表された組織は、脾臓(a)、胸腺(b)、前立腺(c)、精巣(d)、卵巣(e)、小腸(f)、結腸(g)、末梢血白血球(h)、心臓(i)、脳(j)、胎盤(k)、肺(l)、肝臓(m)、骨格筋(n)、腎臓(o)および膵臓(p)を含む。サイズ標準物の泳動パターンがこの図の左側に示されている(サイズはキロベース単位)。

【0041】

図7. 腫瘍細胞系内でのCOASTERの発現。COASTERの相対発現レベルをRT-PCRにより測定した。この図は、該PCR産物のアガロースゲル電気泳動イメージのスキニングにより測定されたPCR産物の相対強度を示す。表されている細胞系は、MCF-7(a)、T-47D(b)、U-2 OS(c)、MG63(d)、HOS(e)、ECC-1(f)、Ishikawa(g)、VE103(h)、HS760T(i)およびSW954(j)を含む。

10

【0042】

図8. エストラジオール(E2)、ラロキシフェンまたは4-ヒドロキシータモキシフェン(4OHT)の添加に応答した、ER β / α キメラ受容体およびCOASTERでトランスフェクトした細胞において光計数/秒(cps)で定量したルシフェラーゼ発現。

20

【0043】

図9. 種々の濃度(濃度の対数で表されている)のラロキシフェン、4-ヒドロキシータモキシフェン(4OHT)、ICI164,384、Org43143、Org39660およびOrg39669の存在下での標準量のエストラジオールの添加に応答したエストロゲン活性(%)。

【0044】

図10. COASTER同時活性化アッセイにおける化合物の効果。

【0045】

図11. ヒトおよびマカク・ファスシキュラタ(M. fasciculata)組織におけるCOASTERの発現。COASTERの相対発現レベルをRT-PCRにより測定した。この図は、Taqmanリアルタイム定量PCR法により測定されたPCR産物の相対強度を示す。RNA材料の起源として使用した組織がこの図の下に示されている。マカク・ファスシキュラタ(M. fasciculata)由来である骨組織以外の全ての組織はヒト由来である。

30

【0046】

(実施例)

ステロイド受容体の新規コアクチベーターの同定

結果および考察

酵母ツーハイブリッドスクリーニング

ホルモン依存的にER β と相互作用するタンパク質としてのCOASTERの同定のために、ER β をベイト(おとり餌)として使用する酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。該ツーハイブリッドシステム系は、GAL応答性プロモーターからHIS3、MEL1、ADE2およびlacZレポーター遺伝子を発現する酵母株(AH109)よりなるものであった。ER β は、このシステム系において、GAL4-DNA結合ドメインとの融合体として発現された。この系においては、ER β は単独では、17 β -エストラジオールの存在下で該レポーター遺伝子を活性化し得ない(結果は示していない)。ER β を発現する宿主株をヒト骨肉腫cDNAライブラリーで形質転換した。このライブラリーは、GAL4トランス活性化ドメインとの翻訳融合体としてcDNAを発現する。ER β とライブラリーコード化タンパク質との間の相互作用は、該レポーター遺伝子の活性化、ならびにヒスチジンおよび/またはアデニンを欠く培地上での増殖を可能にする。合計

40

50

3. 5×10^6 個のコロニーをスクリーニングした。該形質転換酵母細胞を、 $17-\beta$ エストラジオールの存在下およびヒスチジンを欠く培地上での増殖に関して選択した。560 個の HIS^+ コロニーを選択し、 $17-\beta$ エストラジオールの不存在下または存在下、それらの ADE^+ 表現型に関してレプリカプレーティングによりスクリーニングした。ホルモン依存性 HIS^+ 、 ADE^+ 表現型を示した 27 個の酵母形質転換体を選択した。該ライブラリー由来プラスミド DNA をこれらの 27 個のクローンから単離し、観察された表現型が該形質転換 DNA に依存することを確認するために、AH109. pGBT9. ER β 宿主酵母株内に再導入した。酵母 β -ガラクトシダーゼ (lacZ) トランス活性化アッセイにおいては、再試験した 27 個中 21 個の陽性体がホルモン誘導性 lacZ $^+$ 表現型を示した。これらの陽性体の配列分析は、ステロイド受容体に対する 2 つのよく知られたコアクチベーターである UBC9 (ユビキチン共役酵素) および SUG1 を同定した。また、いくつかのジンクフィンガーモチーフと LXXLL ドメインとを有しステロイド受容体とコアクチベーターとの相互作用に関与しているらしい核タンパク質をコードすると予想される cDNA 配列を同定した。この cDNA を更なる研究のために選択し、それは、ステロイド受容体の機能的コアクチベーターをコードすることが判明した。したがって、本発明者らは、この新規コアクチベーターを COASTER と命名した。

10

【0047】

COASTER: ステロイド受容体の新規コアクチベーター

COASTER の一次構造

ツーハイブリッドスクリーニングにおいて単離したプラスミド pACT2. COASTER Δ のインサート挿入断片を配列決定し、BLAST アルゴリズムを使用してこの配列を Incyte Lifeseq Gold および Genbank データベースと比較した。合計 270 個の Incyte EST 配列を同定した。COASTER cDNA の 3' 末端を含有するクローン 2905757 を Incyte Genomics (Palo Alto, USA) から得、完全に配列決定した。また、Genbank データベースの検索は、COASTER 配列が、未知機能の推定タンパク質である KIAA0576 (Nagase ら, DNA Res. 5, 31-39) をコードする遺伝子とほぼ完全な相同性 (99%) を共有することを示した。該 KIAA0576 配列は COASTER のスプライス変異体に相当し、144 塩基対のインフレーム挿入断片を含有する。COASTER cDNA 配列の 5' 末端を同定するために、RACE PCR を用いた。5' 非翻訳領域において異なる 2 つの異なる断片を同定した。図 1 は、完全な COASTER cDNA 配列の概観を示す。最長の RACE 断片に対応する cDNA は、4099 ヌクレオチドの長さを有し、3039 ヌクレオチド (1013 アミノ酸) のオープンリーディングフレームを含有する。該 KIAA0576 は、1061 アミノ酸のオープンリーディングフレームを与える 2832 における 144 ヌクレオチドの挿入断片を示す。COASTER および KIAA0576 のどちらに関しても、該 cDNA から推定されるアミノ酸配列は、9 個のジンクフィンガードメイン (C_2H_2 型)、核局在化部位および LXXLL 核内受容体相互作用モチーフを含有するタンパク質を予想させる。

20

30

【0048】

COASTER cDNA はタンパク質をコードしている

COASTER cDNA が実際にタンパク質をコードしているか否かを調べるために、COASTER の完全なオープンリーディングフレーム (アミノ酸 1-1013) を含有するプラスミド pCDNA3.1HISC. COASTER をインビトロで転写および翻訳した。図 2 は、約 115 キロダルトンのタンパク質が COASTER cDNA にコードされることを示している。該タンパク質の観察されたサイズは、図 1 に示す cDNA 配列の長さとは完全に一致する。該結果は更に、COASTER cDNA が、pBKC-SRC-1 にコードされるタンパク質 (これは公知コアクチベーター SRC-1 のオープンリーディングフレームを含有する) とは異なるタンパク質をコードすることを示している。

40

【0049】

COASTER は酵母内で ER β と相互作用する

50

プラスミド pACT2. COASTER Δ は最初は酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて単離された。このプラスミドにコードされるタンパク質が実際に酵母内で ER β と相互作用することを確認するために、プラスミド pACT2. COASTER Δ を AH109. pGBT9. ER β 受容株内に再導入した。図3は、後続のツーハイブリッドアッセイの結果を示す。該結果は、増殖培地への17 β -エストラジオールの添加が β -ガラクトシダーゼレポーター活性の用量依存的誘導を引き起こすことを示している。これに対して、抗エストロゲン剤であるラロキシフェンは該レポーターの活性を誘導することが不可能である。この不能性は、既に報告されているとおりの抗エストロゲン剤に対する酵母細胞の耐性に関連しているかもしれない (Lyttleら, J. Steroid Biochem. Biol. 42, 677-685; IH, 未公開の結果)。あるいは、それは、ER β の抗エストロゲン剤誘導性コンホメーションが、COASTERとの相互作用を可能にしないことを示している可能性がある。ER β 発現プラスミドまたはCOASTER発現プラスミドの単体での該酵母株の形質転換は、17 β -エストラジオール誘導性 lacZ⁺ 表現型を与えなかった (データは示していない)。総合すると、これらの結果は、ER β およびCOASTERが17 β -エストラジオール依存的に酵母内で相互作用することを示している。該相互作用は、COASTERのLXXLLモチーフには無関係である。なぜなら、このモチーフは、該酵母ツーハイブリッドアッセイにおいて使用したプラスミド pACT2. COASTER Δ によってはコードされていないからである。

10

【0050】

COASTERは哺乳類細胞における機能的コアクチベーターである
哺乳類環背景境中でのCOASTERの機能的役割を調べるために、完全長COASTER (アミノ酸1-1013) cDNAを哺乳類細胞発現ベクター内にクローニングした。ホルモン応答性要素の制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むプラスミドまたはおおよびステロイド受容体発現プラスミドと組合せたCOASTER発現プラスミドでのU-2 OS細胞のコトランスフェクションにより、COASTERの機能的役割を分析した。トランスフェクション後、研究中の受容体に対する適当なホルモンの細胞を刺激した。結果を表1に示す。

20

【0051】**【表1】**

表 1

試験細胞		ホルモン無し	10 ⁻⁸ M 17β- エストラジオール	10 ⁻⁸ M ICI 164,384
1	Erβ	150±14	500 ± 109	134 ± 28
	ERβ+COA STER	133±16	8200 ± 819	101 ± 6
2	ERα	180±22	9505±2122	174 ± 18
	ERα+COA STER	134±18	15400 ± 1179	275 ± 55
			10 ⁻⁸ M Org 2058	
3	PR	62±22	822 ± 112	
	PR+COAS TER	81±48	3229±683	
			10 ⁻⁸ M デキサメタゾン	
4	GR	44±3	1232 ± 82	
	GR+COAS TER	103±33	35245 ± 8679	

10

20

表1の説明：COASTERはステロイド受容体のコアクチベーターである。U-2 OS細胞は、pNGV1. ERβおよびp4ERE-TATA-LUC(1)、pNGV1. ERαおよびp4ERE-TATA-LUC(2)、pKCRE. PRおよびpMMTV-LUC(3)またはpNGV1. GRおよびpMMTV-LUC(4)で一過性にトランスフェクトした。示されている場合には、COASTER発現構築物pCDNA3.1HISC. COASTERを該トランスフェクション混合物に加えた。トランスフェクション後、最上部の行に示されているホルモンと共に該細胞をインキュベートした。この表は、ルシフェラーゼ活性±標準偏差(三重の実験からのもの)を示す。Org 2058 = 16α-エチル-21-ヒドロキシ-19-ノルプレグン-4-エン-3, 20-ジオン。

30

【0052】

表1から認められうるとおり、COASTERはプロゲステロン受容体(PR)、グルココルチコイド受容体(GR)ならびにエストロゲン受容体αおよびβ(ERαおよびERβ)のコアクチベーターである。すべての場合において、アゴニストでリガンド化された受容体の活性はCOASTERの共発現により更に増強される。ERαまたはERβがアンタゴニストICI 164, 384でリガンド化された場合には、COASTERの共発現は該転写活性を増強せず、このことは、COASTERがコアクチベーターとして機能するのを該アンタゴニスト誘導性コンホメーションが可能にしないことを示している。ステロイド受容体の不存在下でCOASTERがトランスフェクトされた場合には、該レポーター遺伝子の活性は誘導されなかったが(データは示していない)、このことは、該ステロイド受容体およびCOASTERの両方が該活性増強に要求されることを示している。

40

【0053】

COASTERはエストロゲン受容体αの半部分アゴニストを同定する

ERαおよびERβに対するCOASTERの同時活性化能を、抗エストロゲン剤ラロキシフェンおよび4OH-タモキシフェンの存在下で更に調べた。比較のために、平行して、ヒトTIF2/SRC-2のマウスオルソログであるコアクチベーターGRIP1を分

50

析した。トランスフェクション実験は、EREレポーターを読取りに使用した場合には、U-2 OS細胞においては、4OH-タモキシフェンがER α の転写活性に関するアゴニストとしては作用するが、ER β の転写活性に関しては作用しないことを示した(図4)。COASTERまたはGRIP1のコトランスフェクションは、4OH-タモキシフェンでリガンド化されたER α の活性の増強を引き起こす。興味深いことに、COASTERはラロキシフェンの存在下で転写を活性化しうる(その化合物は、それ以外の場合にはこの系内でのアゴニストではない)。この現象はER α 媒介転写に関しては観察されるが、ER β がエストロゲン受容体として存在する場合には観察されない。さらに、コアクチベーターGRIP1は、ラロキシフェンおよびER α の存在下、該レポーター遺伝子の発現を活性化し得ない。このデータは、COASTERのトランケート化形態COASTER Δ の活性が、完全長COASTERの活性と同じであることを示している。このことは、ラロキシフェンまたは4OH-タモキシフェンでリガンド化されたER α に対するCOASTERの同時活性化能にはアミノ酸1-234で十分であることを示している。さらに、ER α 媒介転写に対するCOASTERの効果を、COASTERの存在下および不存在下、リガンドであるラロキシフェンおよび4OH-タモキシフェンに関する用量反応曲線を作成することにより調べた。図5に示すデータは、ラロキシフェンがER α およびCOASTERの存在下でERE駆動遺伝子転写に対してアゴニストとして作用するという観察を証明している。COASTERを使用しなかった場合には、ラロキシフェンは、該リガンドの高濃度においてさえも該レポーター遺伝子を活性化し得ない。抗エストロゲン剤である4OH-タモキシフェンはこの系におけるアゴニストである。しかし、COASTERの発現は該転写応答の大きさを増加させる。どちらの化合物に関しても、ER α およびCOASTERの存在下での該レポーターの活性は、該アッセイにおいて用いた濃度に左右される。ここに記載の結果は、COASTERが、ラロキシフェンおよび4OH-タモキシフェンのような混合されたプロフィールの抗エストロゲン剤のアゴニスト/アンタゴニストのバランスに影響を及ぼしうることを示している。従来の報告は、ラロキシフェンが、ER β に対して非古典的(非ERE)経路を介してアゴニストとして作用しうることを示している(Zouら, Mol Endocrinol. 13, 418-430; Paechら, Science 277, 1508-1510)。本発明者らが知る限りにおいては、これらのデータは、古典的エストロゲン応答性要素(ERE)経路上のラロキシフェンの作動性の最初の観察を提供するものである。また、これらは、ラロキシフェンがER α 上でアゴニストとして作用しうることを最初に示すものである。これらの観察は、抗エストロゲン剤の作用のメカニズムを我々が理解する際に重要である。ラロキシフェンでリガンド化されたER α を活性化するCOASTERの特性は、これまでに記載されているGRIP1のようなコアクチベーターからCOASTERを区別するものである。さらに、COASTERは化合物の半部分アゴニスト特性を同定しうるため、本明細書に記載のアッセイは新規エストロゲン受容体リガンドの薬理的スクリーニングに特に有利に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0054】

COASTERの組織分布

COASTER mRNAの組織分布をノーザンブロット分析およびRT-PCRにより調べた。ヒト多組織ノーザンブロットを794bpのCOASTER cDNA断片とハイブリダイズさせた。調べたほとんどすべての組織が約5kBのサイズのmRNA種に対するハイブリダイゼーションを示しており、精巣、卵巣、心臓、胎盤および骨格筋においては、より高いシグナルが示され、その他の組織においては、より低いシグナルが示されるか又は全くシグナルが示されなかった(図6)。さらに、精巣内に特有に存在する4kBの転写産物に対して、非常に強力なハイブリダイゼーションシグナルが観察される。5kBの転写産物のサイズは、本発明者らが単離しているcDNAのサイズと良く合致する。4kBの転写産物は、詳細な構造が未だ明らかでないスプライス変異体に相当しうる。しかし、この転写産物の精巣特異的発現パターンは顕著であり、精巣の生理学における機能的役割を示唆している。また、腫瘍に由来する種々のヒト細胞系において、RT-PC

R分析により、COASTERからのmRNAの発現を調べた。該RT-PCRの半定量的結果を図7に示す。該結果は、乳上皮癌細胞系MCF-7およびT-47ならびに腫上皮細胞系SW954において高い発現を示している。骨肉腫細胞系U-2 OSおよびHOS、子宮内膜上皮癌細胞系Ishikawa、血管内皮細胞系VE103ERαならびに内皮細胞系HS760Tにおいては、中等度の発現が観察された。骨肉腫細胞系MG63および子宮内膜上皮癌細胞系ECC-1においては、発現は検出されなかった。COASTERの高い発現を示す細胞系(MCF-7、T-47D、SW954)は高レベルのERαを含有することが報告されており(Decherinら, Curr. Med. Chem. 7, 561-576)、このことは、COASTERが腫瘍細胞のERα媒介増殖に寄与しうることを示唆している。

10

【0055】

材料および方法

酵母ツーハイブリッドスクリーニング

酵母培地

酵母宿主株および形質転換体を完全培地(YPD)内または最小少合成ドロップアウト(Synthetic Dropout)(SD)培地内で培養した。該完全培地は、酵母株の増殖のための最適比率のペプトン、酵母エキスおよびデキストロースの混合物である(酵母プロトコルハンドブックClontech, Palo Alto, USA, プロトコルPT3024-1を参照されたい)。該最小少SD培地は、2% デキストロース、0.67% 酵母窒素塩基およびアミノ酸とヌクレオシドとの特定の混合物である(例えば、SD-His-Leu-Trpは、ヒスチジン、ロイシンおよびトリプトファンを欠く培地である)。すべてのこれらの培地はBIO101(Beverly, USA)から購入した。

20

【0056】

ツーハイブリッドスクリーニング

サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)株AH109(MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{TATA}-lacZ)は、Clontech, Palo Alto, USAから入手した。酵母株AH109内でベイトとしてERβタンパク質を発現させるために、プラスミドpGBT9.ERβ(W. Kruijer, Rijksuniversiteit Groningen, The Netherlandsにより快く贈呈されたもの)を使用した。このプラスミドは、GAL4 DNA結合ドメインをコードする配列に融合したERβのコード配列(アミノ酸1-530)を含有し、選択マーカーとしてTRP1遺伝子を含有する。標準的な酢酸リチウム法をClontech(Palo Alto, USA, プロトコル#PT3247-1)からの説明マニュアルに従い用いて、酵母株AH109をpGBT9.ERβで形質転換し、形質転換体をSD-トリプトファン(SD-Trp)プレート上で選択した。このプレートから、単コロニーを選択し、親クローンとして保存した。ついで、これらのクローンのHIS3バックグラウンド発現を、適当な選択プレート上でのプレーティングにより判定した。17β-エストラジオールが存在下のヒスチジン欠損培地上で増殖するクローンを捨てた。ついで、低いHIS3バックグラウンド発現を有するクローンを、酵母内でエストロゲン受容体と相互作用することが示されたコアクチベーターGRIP1をコードするプラスミド(Hongら, Mol. Cell. Biol. 17:2735-2744)である陽性対照pGRIP1(M. Srallicup Stallcup, University of Southern California, USAにより快く贈呈されたもの)で形質転換した。ついで、pGRIP1および17β-エストラジオールが存在下で高いHIS3発現を示した親クローン(AH109.ERβ)を、該ライブラリーのスクリーニングのための受容クローンとして選択した。ヒト骨肉腫Matchmaker cDNAライブラリーをClontech(Clo

30

40

50

ntech, Palo Alto, USA, cat. # : HL4026AH) から入手した。このライブラリーは、GAL4 活性化ドメイン (AD) と融合したクローン化インサート挿入断片を発現し選択マーカーとして LEU2 遺伝子を含むベクター pACT2 において構築した。受容クローン AH109, ER β を、該骨肉腫 cDNA ライブラリーからの 100 μ g のプラスミド DNA で形質転換した。形質転換体を、 10^{-8} M 17β -エストラジオールを含む SD-Trp-Leu-His プレート上で選択し、HIS⁺ コロニーを同定した。 10^{-8} M 17β -エストラジオールの不存在下および存在下、SD-Trp-Leu-His-Ad 培地上でのプレートプレパレーションにより、HIS⁺ コロニーを再スクリーニングした。ホルモン依存性 HIS⁺ / ADE⁺ 表現型を示した酵母形質転換体を後続の研究のために選択した。これらの形質転換体から、粗 (クルード) ミニプレップ単離に関するプロトコル (基本プロトコル Y1. 4 を参照されたい) に従い、DNA を単離した。該粗ミニプレップを使用して、エレクトロポレーションにより大腸菌 (E. coli) KC8 を形質転換し、該ライブラリー由来プラスミドを含む形質転換体をロイシン欠損培地上で選択した。ライブラリーインサート挿入断片を Perkin Elmer (Norwalk, USA) からの ABI シークエンサー上で配列決定した。Blast 類似性検索を Incyte データベースに対して行った。

【0057】

酵母における β -ガラクトシダーゼに関する化学発光レポーター遺伝子アッセイ：単コロニーを液体 SD-Trp-Leu 培地内で 30℃ で一晩培養した。これらの一晩培養物を、96 ウェル培養プレート内の 90 μ l の SD-Trp-Leu 培地中で 0.1 の OD₆₀₀ まで希釈した。10 μ l の 10 回濃縮ホルモンストック溶液を加え、プレートを、2000 rpm の激しい振とう下、30℃ で 5 時間インキュベートした。ついで、Tropix (Tropix, Inc., Avenue, Bedford, USA) の Galacton Plus 化学発光検出システム系および一工程酵母細胞溶解 (One-Step Yeast Lysis) バッファーを使用して、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。Victor 装置 (Perkin Elmer, Norwalk, USA) を使用して、発光をモニターした。

【0058】

COASTER の 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) : COASTER cDNA の 5' 末端を単離するために、ヒト精巣 Marathon-R ready cDNA (Clontech, Palo Alto, USA, Cat. # 7414-1) を使用して、5' RACE-PCR 実験を行った。遺伝子特異的プライマー CAGACACCCACGTGTGGCC と共に Marathon cDNA 増幅キット (Clontech, Palo Alto, USA) を該製造業者の説明に従い使用して、RACE PCR を行った。2 つの異なる断片 (~650 bp および ~800 bp) を得た。該断片をアガロースゲルから単離し、Quiaquick 遠心カラム (Qiagen, Valencia, USA) を使用して精製し、pCR2.1 TOPO キット (Invitrogen, Carlsbad, USA) を使用してクローニングした。遺伝子特異的プライマー CAGACACCCACGTGTGGCC および AAGCCACCATGGACAGCAGGAGCAGTGGTG を使用するコロニー PCR により、インサート挿入断片を含むコロニーを同定した。陽性クローンの配列分析を ABI シークエンサー (Perkin Elmer, Norwalk, USA) 上で行った。

【0059】

組換えプラスミド：まず、COASTER のトランケート化形態をコードするプラスミド (pACT2. COASTER Δ アミノ酸 1-234) を酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいて単離した。このプラスミドからのインサート挿入断片を哺乳類細胞発現ベクター pCDNA3.1HISA (Invitrogen, Carlsbad, USA) 内にクローニング

して、プラスミド pCDNA3.1HISA.COASTER Δ を得た。該COASTER cDNAの3'末端を含有するプラスミドをIncyte Genomics (Palo Alto, USA) から得た。このプラスミド (Incyte クローン ID 2905757) を SacI/NotI (アミノ酸 330-1061) で消化した。プライマー CTA GGT ACC GGC AGC AGG AGC AGT GGT GC (配列番号 15) および GGC AGT GAG CTT CCA TGT GGG (配列番号 16) (制限部位に下線が付されている) を使用して、ヒト精巣 Marathon Ready cDNA (Clontech, Palo Alto, cat. #7414-1) 上、PCRにより、該COASTERの5'末端 (アミノ酸 1-332) を増幅した。得られたPCR産物をKpnI および SacI で消化し、SacI-NotI 制限断片と共に、KpnI-NotI 制限 pCDNA3.1HISC ベクター (Invitrogen, Carlsbad, USA) 内に連結した。後者のプラスミドを pCDNA3.1HISC.COASTER と命名した。トランスフェクション研究のために、ヒトエストロゲン受容体 α および β ならびに グルココルチコイド受容体の cDNA のタンパク質コード領域を哺乳類発現ベクター pNGV1 (アクセッション番号 X99274) 内に挿入した。プロゲステロン受容体のタンパク質コード領域を哺乳類発現ベクター pKCRE (Stamら, Eur. J. Pharmacol. 227, 153) 内に挿入した。レポータープラスミド pMMTV-LUC を、ベクター pManMneoLUC (Clontech, Palo Alto, USA) を修飾することにより構築した。該ネオマイシンカセットを、endoR HindIII/BamHI での消化およびそれに続くクレノウポリメラーゼでの平滑化および T4 DNA リガーゼによる連結により除去した。レポーターベクター 4ERE.TATALLuc は4つのエストロゲン応答性要素 (ERE) の制御下でルシフェラーゼ遺伝子を含

有し、P. v. d. Saag (Nederlands Instituut voor Ontwikkelingsbiologie, Utrecht, The Netherlands) から贈られたものである。GRIP1 の哺乳類発現プラスミドは、EcoRI および BamHI での pGRIP1 (M. Stallcup, University of Southern California, USA により快く贈呈されたもの) の制限消化により構築した。得られた断片を、EcoRI/BamHI で消化された pCDNA3.1HISC ベクター内に連結して、プラスミド pCDNA3.1HISC.GRIP1 を得た。

10

20

30

【0060】

細胞培養および一過性トランスフェクション：

U-2 OS 細胞を ATTC (HTB-96) から得、フェノールレッドを含有しない M505 培地中の単層培養として湿気雰囲気 (5% CO₂) 中で 37℃ で維持した。後者の培地は、2.5 mg/ml 炭酸ナトリウム、55 μ g/ml ビルビン酸ナトリウム、2.3 μ g/ml β -メルカプトメタノール、1.2 μ g/ml エタノールアミン、360 μ g/ml L-グルタミン、0.45 μ g/ml 亜セレン酸ナトリウム、62.5 μ g/ml ストレプトマイシンおよび 5% 木炭処理ウシ胎仔血清 (Hyclone) で補足された栄養培地 (Nutrient Medium) F12 (Ham's F12, Gibco BRL, Breda, the Netherlands) とダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, Gibco BRL, Breda, the Netherlands) との混合物 (1:1) よりなる。1.10⁵ 個の細胞を 24 ウェル組織培養プレート内に播き、リポフェクチン (Gibco BRL, Breda, the Netherlands) を使用して DNA を導入した。この目的のために、62.5 μ l の Optimen (Gibco BRL Breda, the Netherlands) 中のプラスミド DNA を等容積の希釈リポフェクチン試薬 (62.5 μ l の Optimen 中の 1.75 μ l のリポフェクチン) と混合し、室温で 30 分間放置した。該細胞を無血清 M505 培地で 1 回洗浄した後、250 μ l の Optimen および該 DNA-リポフェクチン混合物を該細胞に加えた。37℃ (5% CO₂) で 5 時間インキュベートした後、5% 木炭処理ウシ胎仔血清で補足された M505 培地で細胞を 1 回洗浄し、ホ

40

50

ルモンを該培地に加えた。細胞を37℃で一晩インキュベートした。翌日、細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で1回洗浄し、75μlの細胞溶解バッファー(0.1Mリン酸バッファー, pH7.8, 0.2% Triton X-100)の添加により細胞抽出物を作製した。室温で5分間インキュベートした後、30μlのアリコートに50μlのルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega; Wisconsin, USA)に加えた。Victor Instrument(Perkin Elmer, Norwalk, USA)を使用して、発光を測定した。

【0061】

ノーザンブロット分析：

プラスミドpCDNA3.1HISA.COASTERΔをEcoRIおよびXbaIで消化して、プローブ(ヌクレオチド183-928)を得た。Ready-To-Go DNA標識ビーズを製造業者(Pharmacia)の説明に従い使用して、該DNA断片を $[a^{32}P]$ dCTPで標識した。ヒト多組織ノーザンブロット(Clontech, Palo Alto, USA, cat. #7760-17および7759-1)を $a^{32}P$ dCTP標識DNA断片とハイブリダイズさせた(基本プロトコールR1.5を参照されたい)。以下の洗浄条件を用いて、ノーザンブロットを洗浄した：2×30分間の2×SSC/0.1% SDS(65℃)および1×15分間の1×SSC/0.1% SDS(65℃)。

【0062】

細胞系におけるCOASTER発現のRT-PCR分析：

Superscript IIキット(BRL)を使用して、RNAzol B(Cinna/Bio-tec)を使用して多数のヒト細胞系から単離した2μgの全RNAを使用して、cDNAを作製した。一部のcDNAをCOASTERの特異的PCR増幅(プライマーはセンスTGAGGCATCTGAGTCAACAおよびアンチセンスCGAGCCAGAGTTAAAGCA)に使用した。20、25、30および35のPCRサイクルの後、サンプルを採取した。該PCRサンプルを1.5%アガロースゲル上で分析した。ゲルイメージをImagequant 5.0(Molecular dynamic s)で定量した。

【0063】

インビトロ翻訳：

TnT共役網状赤血球ライセートシステム系(Promega, Madison, USA, cat. #L5020)を、該ライセートと共に提供された説明書に従い、 $[^{35}S]$ メチオニンの存在下、pCDNA3.1HISC.COASTER鋳型からのCOASTERのインビトロ転写/翻訳に使用した。平行して、プラスミドpBK-SRC-1(Onate, Science 270, 1354-1357)にコードされるSRC-1の断片を対照として分析した。標識タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、オートラジオグラフィにより可視化した。

【図面の簡単な説明】

【図1】COASTERのヌクレオチドおよびアミノ酸配列の具体例である。

【図2】pCDNA3.1HISC.COASTERをインビトロで転写し、翻訳し、分析した結果。電気泳動パターン of オートラジオグラフを示す。

【図3】 10^{-8} M 17β-エストラジオール(陰影付き斜線の棒線)および 10^{-5} M ラロキシフェン(黒塗りの棒線)に応答した該形質転換酵母細胞のβ-ガラクトシダーゼ活性を示す。

【図4】ホルモンの不存在下(白抜きの棒線)または 10^{-7} M ラロキシフェン(陰影付き斜線の棒線)もしくは 10^{-7} M 4OH-タモキシフェン(黒塗りの棒線)の存在下で該細胞をインキュベートした後のルシフェラーゼ活性(l.a.)を示す。

【図5】漸増濃度のラロキシフェン(正方形で示されている)または4OH-タモキシフェン(三角形で示されている)と共に該細胞をインキュベートした後のルシフェラーゼ活性(l.a.)を示す。

【図6】COASTER転写産物の組織分布。該プロットのオートラジオグラフを示す。

【図7】腫瘍細胞内でのCOASTERの発現。該PCR産物のアガロースゲル電気泳動イメージのスキニングにより測定されたPCR産物の相対強度を示す。

【図8】エストラジオール（E2）、ラロキシフェンまたは4-ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）の添加に応答した、ER β / α キメラ受容体およびCOASTERでトランスフェクトした細胞において光計数/秒（cps）で定量したルシフェラーゼ発現。

【図9】種々の濃度（濃度の対数で表されている）のラロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン（4OHT）、ICI164,384、Org43143、Org39660およびOrg39669の存在下での標準量のエストラジオールの添加に応答したエストロゲン活性（%）。

【図10】COASTER同時活性化アッセイにおける化合物の効果。

【図11】ヒトおよびマカク・ファスシキュラタ（*M. fasciculata*）組織におけるCOASTERの発現。COASTERの相対発現レベルをRT-PCRにより測定した。この図は、Taqmanリアルタイム定量PCR法により測定されたPCR産物の相対強度を示す。

10

Figure 1

[illegible]

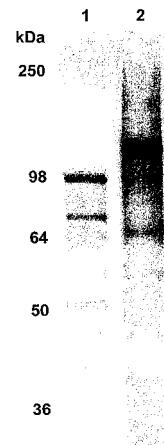
```

3301 TGAAGAGCTGAGATACGAACTCTTGAGTTTGTCTTAAAGGAGACGAAATCCACT
3361 ATTCAAGGTATTTGAAGACATTTTGTGCTTCAATGTTTCAAAATTTGACCTTGTGT
3421 TTGTATTTTGTGCTTAAAGTCCAGATCTTGAAGAGAAATGAGATGAGCTTGTGGA
3481 ATATTAATATATGATCTTAAATAGGTGAGAGTTTCCAGTTTAACTTGAATTTATAT
3541 ATTTAGATTTAAGAGATTTAAAGAAAGAGCTTGAAGATTTTCCCAATGAGAT
3601 TGAATCTTTAAATTTTATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3661 AATGAAATTAAGAAAGTGTGATAGTCAAGTTTCCCAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3721 ATATTTATTTAGATCTTGAAGATCTTGTGCTTGTATTTAGAGAGAGGTAAATGAGAG
3781 TGGCTCTGGAAGATTTAAATTTTATGAGATCTTCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3841 AATTTATGCTTTAATGAGAGAGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3901 AGAAATGATTTAAATGAGAGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
3961 TGTATGCTGCTGCTGCTTAAAGGAGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4021 AAGAGTCTTCTTATATATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4081 CTTACCTGAGATATCTTCTTACCTTGAATTTTATTTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4141 GTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4201 ATATGAGAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4261 TCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4321 AATATTTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4381 TCTTATTTTAAAGAGAGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4441 TATTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4501 TTTTATTTTATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4561 ATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4621 GTATGCTTAAAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4681 ATCTGAGAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4741 CAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4801 TGTGAGAGAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4861 AAGGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4921 GGTGCTTAAAGTCTTAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
4981 AAAAAATCTTAAATTC

```

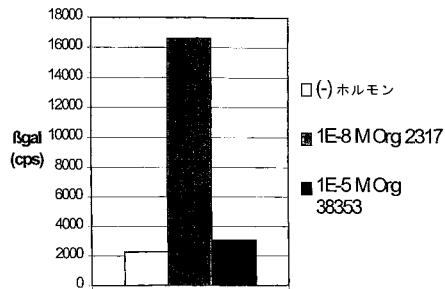
【図 2】

Figure 2



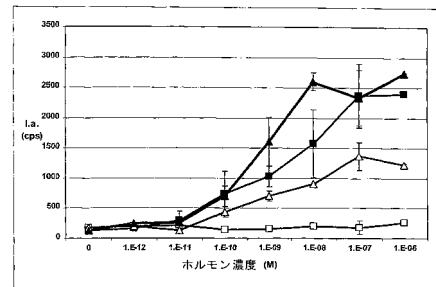
【図 3】

Figure 3



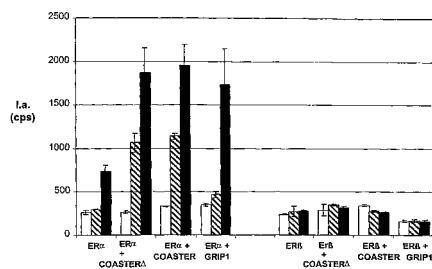
【図 5】

Figure 5



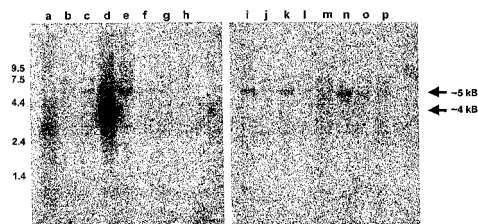
【図 4】

Figure 4



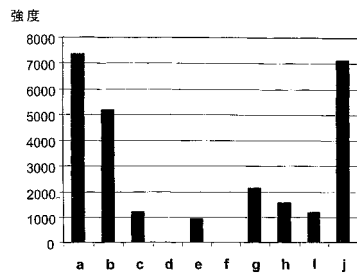
【図 6】

Figure 6



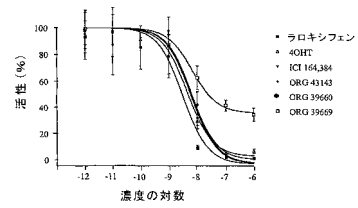
【図 7】

Figure 7



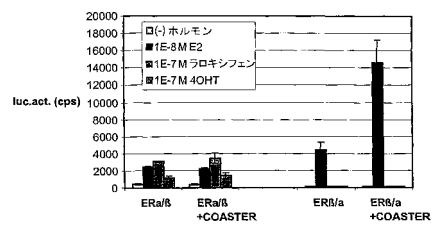
【図 9】

Figure 9



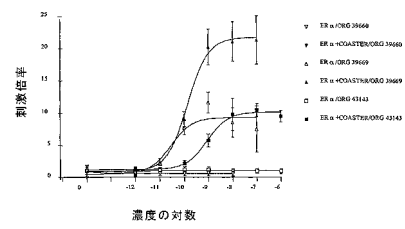
【図 8】

Figure 8



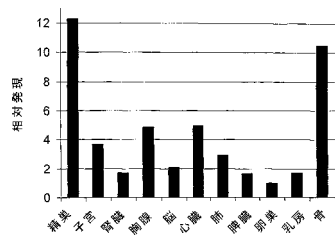
【図 10】

Figure 10



【図 11】

Figure 11



【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
28 February 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/16426 A2(51) International Patent Classification⁷: **C07K 14/47****Koen, Jacob** [NL/NL]; Haertseveldweg 258, NL-6532
XW Nijmegen (NL); **MOSSELMAN, Sietse** [NL/NL];
De Edelenburg 34, NL-5346 VM Oss (NL).

(21) International Application Number: PCT/EP01/09499

(22) International Filing Date: 16 August 2001 (16.08.2001)

(74) Agent: **KRAAK, Hajo**, Patent Department Organon, P.O.
Box 20, Wethoeder van Eschstraat 1, NL-5340 BH Oss
(NL).

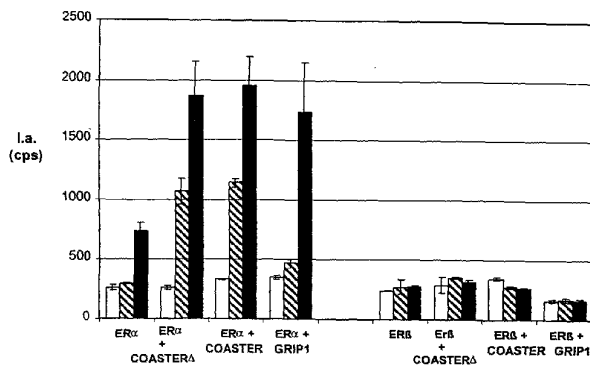
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
00202905.6 21 August 2000 (21.08.2000) EP
01201771.1 14 May 2001 (14.05.2001) EP(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(71) Applicant (*for all designated States except US*): **AKZO**
NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Ar-
nhem (NL).(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **DECHERING,**

[Continued on next page]

(54) Title: COACTIVATION OF NUCLEAR RECEPTORS



(57) Abstract: The invention provides a protein having an amino acid sequence as in SEQ ID 7, 8, 11 or 12, similar proteins, naturally occurring variants and homologous functional equivalents thereof, as well as the use of a polynucleotide encoding such protein, for use in an assay and for use in a method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator, which coactivator is the mentioned protein and is named COASTER, and which nuclear receptor is preferably a steroid receptor.

WO 02/16426 A2

WO 02/16426 A2



CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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.

Published:

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

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

COACTIVATION OF NUCLEAR RECEPTORS

This invention relates to a new protein, to an assay for binding between a responsive nuclear receptor and a coactivator and to a method of
5 modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor.

This invention is in the field of the use of functions of nuclear receptors in organisms. Nuclear receptors have a wide range of function, but their
10 most conspicuous role is to enable cells to respond to hormones, such as estradiol, cortisol, and progesterone. Via the nuclear receptors the hormones influence gene transcription in cells, whereby the cells can change their function. Furthermore, it is known that the activation of gene transcription by nuclear receptors is facilitated or even enabled by
15 coactivators. Several such coactivators are known. For example, Nishikawa et al (Toxicol. Appl. Pharmacol. 154, pp 76-83, 1999) describe screening methods for chemicals with hormonal activities using the interaction of nuclear hormone receptors with a coactivator. Their method is based on the finding that the interaction between the
20 coactivator and a nuclear receptor, which is responsive to that particular coactivator, can be stabilised by a ligand that binds to the nuclear receptor. Such assays are also important in order to unravel the action of hormones and mechanisms for control of transcription of genes in general. With these techniques new medicines can be developed in order
25 to specifically influence physiological processes related to the functioning of nuclear receptors for therapeutic, diagnostic, cosmetic and contraceptive purposes.

This invention makes a protein available which has the amino acid sequence as given in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12. Such a protein has the
30 effect of coactivating a responsive nuclear receptor in its DNA-transcription promoting function.

With the finding of the function of such a protein as a coactivator this invention also provides a new method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator in a
35 system, comprising the addition of an agent to the system, which agent interferes with, or enhances, the function of the coactivator of this invention. This method can be performed both by introducing the gene

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

2

for the coactivator in the system in order to bring it into expression as well as by identification and subsequent use of compounds which can change the functioning of the coactivator and/or the coactivator-nuclear receptor complex. Thus the term agent refers here, for example, to a
5 chemical compound or to a vector, which vector comprises the gene encoding the protein of the invention. Such modulation can be used to interfere with, or to enhance, nuclear transcription processes for therapeutic, contraceptive, diagnostic and cosmetic purposes and it can be used in assays for quantification of the modulation. Thus, the term
10 system refers to a molecularly and/or biologically defined environment and refers to in vitro systems as well as to in vivo systems in which the modulating agent can be introduced. In vitro systems are mixtures allowing DNA and/or RNA transcription/translation and in vivo systems are cells, which can be either in a cell or tissue culture or within a
15 human or animal body. Obviously, the term modulation of the activity of a nuclear receptor can mean either an increase or a decrease in the transcriptional activity of the receptor, whereas the term coactivation means the enhancement of the transcriptional activity of the receptor.

20 A sequence, putatively representing such a protein, is reported previously with gene number KIAA0576 in a publication by Nagase et al. (DNA Research vol 5, pp 31-39, 1998) by reference to accession number AB011148 for the EMBL /GenBank/DDBJ databases, where it is linked to protein_id BAA25502. The gene KIAA0576 was not made to expression
25 beyond the RNA stage and no more specific function other than nucleic acid management was assumed based on a very weak homology (<30% identical nucleotides) to a known DNA sequence.

Since it is obvious that minor modifications in the sequence of the
30 protein are equally useful for the above described use, the invention also provides for a protein having an amino acid sequence which has at least 90%, or preferably at least 95%, more preferably at least 99% and most preferably 100% similarity to the sequence in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12. The term similarity refers to a degree of similarity between proteins in
35 view of differences in amino acids, but which different amino acids are functionally similar in view of almost equal size, lipophilicity, acidity etc. A percent similarity can be calculated by optimal alignment of the

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

3

- sequences using a similarity scoring matrix such as the blosum62 matrix described in Henikoff and Henikoff (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89; 10915-10919 (1992)). Calculation of the percentage similarity and optimal alignment of two sequences using the blosum62 similarity matrix and the algorithm of Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) can be performed using the GAP program of the Genetics Computer Group (GCG, Madison, Wisconsin, USA) using the default parameters of the program.
- 10 It is a further aspect of the invention that the above described coactivating function can also be obtained with a protein having the sequence of amino acid number 1-234 in SEQ ID's 7 or 8. It is known that truncated proteins can have the same or partially the same function as the larger protein. It was found that this truncated protein can also be
- 15 used and therefore this aspect of the invention also provides a protein having a sequence which has at least 90%, or preferably at least 95%, more preferably at least 99% and most preferably 100% similarity to the sequence of amino acid number 1-234 in SEQ ID's 7 or 8.
- 20 It is a further aspect of the invention to provide a protein which is a naturally occurring variant of a protein having the sequence as in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12. Proteins which have at least 80% similarity, preferably at least 90%, more preferably at least 95%, even more preferably at least 99% and most preferably 100% similarity to the protein defined in SEQ
- 25 ID's 7, 8, 11 or 12 and originating from human tissues or tissues of non-human species can likewise be used for coactivating a responsive nuclear receptor. Such polymorphic forms and species homologues are also included in the class of proteins made available by this invention. A naturally occurring protein belonging to the class defined by
- 30 commonalities in the indicated structure and function of the protein defined by SEQ ID's 7, 8, 11 or 12, will be named by the arbitrary letter sequence COASTER proteins. In earlier documents, at least in documents having circulated within our research organisation the arbitrary letter sequence MFC has been used in order to provide a name for the proteins
- 35 according to this invention. Thus, MFC and COASTER are synonyms. Other COASTER fragments also occur in biological tissue. Such fragments are encoded by splice variants.

Furthermore, having disclosed the structure of the protein and function of a COASTER protein, the invention also provides a protein which is a homologous functional equivalent of the protein as defined above. A
5 homologous functional equivalent is a protein, which does not fulfill completely the earlier defined characteristics, because it has either less similarity than one of the above indicated percentages, or it is not the fragment as defined above, or it is of non-natural origin, but still has a characteristic function in common with the earlier defined proteins of the
10 invention. For example, a fragment of a COASTER protein, can not only be used by itself for coactivation of the responsive nuclear receptor, but can also be fused with other protein sequences known from other proteins in order to take advantage of the nuclear receptor activating effect. Such fragments need not be 100% identical to the sequences of
15 fragments of intact COASTER-proteins. Moreover, proteins functionally equivalent to COASTER proteins and splice variants thereof can be made artificially by deliberate mutations, insertions or deletions in the encoding poly-nucleotide sequence. A large degree of similarity of a protein with a protein specifically characterised in this description make
20 a protein functionally equivalent to a COASTER protein. In this description a protein of this invention refers to any structurally similar or functionally equivalent artificial protein, splice variant or COASTER protein as defined above.

25 In view of the usefulness of the proteins, it is an aspect of the invention to provide the use of a polynucleotide encoding the protein of this invention by bringing the polynucleotide into expression in a system which also comprises a responsive nuclear receptor. The polynucleotide can either be a DNA or an RNA since both a DNA nucleotide sequence as
30 well as an RNA sequence will serve the purpose of encoding the proteins of the invention. Preferred DNA's for use in this invention are the sequences given in SEQ ID's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 or 10. Expression can be obtained by artificially incorporating the polynucleotide in eukaryotic cells, bacteria, plasmids or vectors and enabling transcription of the gene
35 by methods generally known in the art. The system, which can be a mixture with components for DNA or RNA transcription and/or translation or an intact cell, possibly part of a whole organism, should

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

5

also contain or generate the responsive nuclear receptor in order to be able to use the interaction between the protein of the invention and the nuclear receptor. A practical source of information on these techniques can be found in Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory

5 Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.

In the context of nucleotides one can also refer to degrees of similarity, whereby nucleotide triplets encoding the same amino acid can replace triplets in the above sequences. More common is to refer to homologous
10 sequences of nucleotides:

Homology of a polynucleotide is defined as:

$$\text{Homology (\%)} = \frac{\text{Number of identical residues between two sequences}}{\text{Length of aligned sequences - Length of all gaps}}$$

after optimal alignment of the sequences. Optimal alignment can be performed using the algorithm of Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970)) that maximizes the number of matches and
20 minimizes the number of gaps. In fact, a more restricted range of proteins can be defined by replacing the term similarity by homology having the analogous definition of homology of a polynucleotide. Such a use of the term homology for a protein of the invention is based on the percentage identity of amino acid residues in the protein. Alternatively, the term
25 degree of homology of a protein defined in this way, may also be replaced by the term degree of identity of a protein.

To accommodate codon variability, the invention also includes polynucleotide sequences coding for the same amino acid sequences as
30 the sequences disclosed herein. The sequence information as provided herein should not be so narrowly construed as to require exclusion of erroneously identified bases. The specific sequence disclosed herein can readily be used to isolate the complete genes of several other species or allelic variants. The sequence can e.g. be used to prepare probes or as a
35 source to prepare synthetic oligonucleotides to be used as primers in DNA amplification reactions allowing the isolation and identification of the complete variant genes. The complete genetic sequence can be used

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

6

in the preparation of vector molecules for expression of the protein in suitable host cells.

The present invention further relates to polynucleotides having slight variations or having polymorphic sites. Polynucleotides having slight variations may encode variant polypeptides which retain the same biological function or activity as the natural, mature protein. Polymorphic sites are useful for diagnostic purposes.

In another aspect, the invention provides for a method to isolate a polynucleotide comprising the steps of: a) hybridizing a DNA according to the present invention under stringent conditions against nucleic acids being RNA, (genomic) DNA or cDNA isolated preferably from tissues which highly express the polynucleotide of interest; and b) isolating said nucleic acids by methods known to a skilled person in the art. The tissues preferably are from human origin. Preferably ribonucleic acids are isolated from oocytes, ovaria or testes. The hybridization conditions are preferably highly stringent.

According to the present invention the term "stringent" means washing conditions of 1 x SSC, 0.1% SDS at a temperature of 65 °C; highly stringent conditions refer to a reduction in SSC towards 0.3 x SSC, more preferably to 0.1 x SSC. Preferably the first two washings are subsequently carried out twice each during 15-30 minutes. If there is a need to wash under highly stringent conditions an additional wash with 0.1 x SSC is performed once during 15 minutes. Hybridization can be performed e.g. overnight in 0.5M phosphate buffer pH7.5/7% SDS at 65 °C.

As an alternative the method to isolate the gene might comprise gene amplification methodology using primers derived from the nucleic acid according to the invention. Complete cDNAs might also be obtained by combining clones obtained by e.g. hybridization with e.g. RACE cDNA clones.

In order to use the modulation of transcription the system should also comprise genes for responsive nuclear receptors and responsive promoter elements for these nuclear receptors. The poly-nucleotide encoding a protein of this invention can be used for the production of recombinant COASTER protein to serve, in combination with a recombinant nuclear

receptor protein, in an assay for binding of the protein with the responsive nuclear receptor.

- The term responsive nuclear receptor is used in this description to refer to any nuclear receptor that can be activated by a COASTER-protein. Preferably the nuclear receptor in the system of the assay is a steroid receptor, or more preferably a progestogen receptor, an estrogen receptor or a glucocorticoid receptor.
- A method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator according to this invention can be an in vitro assay for determination of the degree of modulation and comprises quantifying the degree of modulation. Provisions for quantification of the degree of modulation or binding may comprise a yeast two-hybrid assay such as described here or an analogous two-hybrid assay in a mammalian cell system. Alternatively, the binding efficiency may be measured using isolated recombinant proteins of COASTER and the nuclear receptor that are suitably labelled to allow detection of the binding efficiency. Labelling of the proteins may involve radioactive or fluorescent molecules or molecules with enzymatic properties that are directly or indirectly attached to the recombinant proteins. Alternatively, the binding efficiency may be measured by an affinity based biosensor system such as the BIACORE. Alternatively, the binding efficiency might be measured by in vitro or in vivo complementation assays that use the interaction of COASTER protein and the nuclear receptor to drive complementation of a functional protein, such as β -galactosidase or dihydrofolate reductase, whereby the function of the complemented protein is used as a measure for the binding efficiency.
- The method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator according to this invention can also be a treatment of the human or animal body comprising the administration of the agent to the human or animal. Such an agent can be a vector inserting the gene for the coactivator into cells of the organism thereby enabling production of more coactivator for activation of the nuclear receptor or it can be a vector inserting a gene for a defective coactivator into cells of the organism thereby enabling

production of a protein according to the invention which interferes with the action of the endogenous COASTER protein, resulting in diminished action of the nuclear receptor. The agent can also be a chemical compound which influences the interaction between the coactivator and the responsive nuclear receptor. Such a compound can be obtained by routine screening in an assay for binding between the coactivator and the responsive nuclear receptor or in an assay for quantification of the modulation of the action of the responsive nuclear receptor.

It is therefore a further aspect of the invention that the assay or method according to the invention can be used to select compounds which modulate the binding between a COASTER protein and a responsive nuclear receptor, or which modulate the activity of a nuclear receptor-COASTER complex. In such an assay, compounds are being tested for their ability to induce or perturb an interaction between COASTER and a responsive nuclear receptor, or, alternatively, upon their ability to modulate transcription via a responsive nuclear receptor and in the presence of COASTER and a reporter DNA.

A reporter DNA consists of a promoter that is responsive to the nuclear receptor under study, and a reporter gene whose transcriptional activity can be monitored. The promoter may either be an isolated natural promoter of a nuclear receptor-responsive gene, or a synthetic cassette of (multiple copies of) a consensus nuclear receptor responsive element fused to a basal core promoter (e.g. a TATA box). Suitable reporter genes include genes that encode enzymes whose activity can be monitored via an enzymatic assay (e.g. luciferase or β -galactosidase), genes that encode proteins with fluorescent properties (e.g. Green Fluorescent Protein), or genes whose transcripts levels can be monitored.

The latter assay is particularly advantageous because COASTER potentiates the action of an estrogen-receptor-responsive element (ERE) containing promoter in the presence of the estrogen receptor α and a partial agonist, thereby enabling the identification of novel partial agonists. Known ERE-based assays are not able to recognize all partial agonists (e.g. raloxifen).

The invention also provides a pharmaceutical composition as a medicine for the mentioned method of modulation of transcriptional activity

WO 02/16426

PCT/EP01/09499
NO 2001/0102499

9

promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator in a system, comprising the administration of an agent to a human or animal body, which agent interferes with, or enhances, the function of the coactivator of this invention. This the invention also provides a pharmaceutical
5 composition for use in the mentioned, which pharmaceutical composition comprises the agent which interferes with, or enhances, the function of the coactivator. As explained above a compound identified with the assays provided by the invention can interfere with, or enhance, the function as coactivator of the protein of the invention. Alternatively, a
10 vector comprising the gene for a protein according to the invention can be formulated for medicinal use.

A method of preparation of a medicine by mixing the agent with one or more pharmaceutically acceptable auxiliaries such as described in the standard reference Gennaro et al., Remington's Pharmaceutical
15 Sciences, (18th ed., Mack publishing Company, 1990, see especially Part 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture.) is well known in the art. Suitable auxiliaries are described in e.g. the Handbook of Pharmaceutical Excipients (2nd Edition, Editors A. Wade and P.J. Weller; American Pharmaceutical Association; Washington; The Pharmaceutical
20 Press; London, 1994). The mixture of the agent and the pharmaceutically acceptable auxiliary may be compressed into solid dosage units, such as pills, tablets, or be processed into capsules or suppositories. By means of pharmaceutically suitable liquids the agent can also be applied as an injection preparation in the form of a solution, suspension, emulsion, or
25 as a spray, e.g. nasal spray. For making dosage units, e.g. tablets, the use of conventional additives such as fillers, colorants, polymeric binders and the like is contemplated.

Such pharmaceutical compositions can be used in a COASTER-activated nuclear receptor related treatment, more specifically against hormone
30 stimulated tumor growth, for male or female contraception, for the treatment of menopausal complaints and post-menopausal disorders in women, for anabolic drug treatment, for heart diseases and for the treatment of aging due to reduced hormonal activity.

Since the COASTER protein displays a tissue-specific expression profile,
35 such medicines may contribute to tissue-specific treatments. Moreover, the presence or modulation of COASTER may alter the pharmacology of nuclear receptor ligands. For example, raloxifen is usually an antagonist,

but when COASTER is clearly expressed in the cell, raloxifen displays agonistic properties.

Properly labelled poly-nucleotides having a sequence encoding proteins for the invention or fragments thereof are also made available by this

5 invention. These can be used in methods of diagnosis by stringent quantitative hybridisation of RNA in order to identify diseases related to abnormal expression of COASTER-RNA in an organism. These methods can advantageously involve the use of such a labelled poly-nucleotide having a length of at least 500 nucleotides, in order to have accurate
10 identification of RNA with hybridisation. However a length of between 20 and 50 nucleotides can also be preferred as being more practical and still effective for this purpose. For diagnostic purposes, expression of the COASTER mRNA can also be detected by nucleotide chain reaction, such as reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). To this end,
15 cDNA is synthesized from RNA isolated from a sample specimen using a reverse transcriptase enzyme. The cDNA is subsequently used as a template in a polymerase chain reaction in the presence of a COASTER antisense and sense oligonucleotide primer. The amount of amplified PCR product, that can be determined by isotopic or non-isotopic labeling in
20 combination with appropriate detection methods or by direct spectrophotometric or colorimetric methods, reflects the relative expression level of the COASTER mRNA.

Labelling can be done in various ways. In the case of radioactive
25 labelling, hybridisation of poly-nucleotides may be measured by quantitation of the number of disintegrations per second of the radiolabeled hybrid. Alternatively, hybridised radiolabeled fragments may be visualized by autoradiography or similar methods.

Non-isotopic labelling methods often make use of biotinylated nucleotides
30 that are incorporated during labelling of the fragment. Successfully hybridised fragment can subsequently be detected by virtue of the incorporated biotin. The biotin moiety can be detected using an avidin molecule conjugated to a molecule with fluorescent or enzymatic properties. The amount of fluorescence or enzymatic activity is used as a
35 measure for the hybridisation efficiency.

The diagnostic method will be particularly useful for diseases involving tumour growth. It is striking that the COASTER gene is strongly

- expressed in tumor cell lines. The diagnostic method can be performed by scanning or taking biopsies from the organism to be diagnosed, but the method can be strictly limited to a method which is not practised on the human or animal body. In that situation the method comprises in vitro
- 5 testing of available biological material for hybridisation. In view of the sensitivity of the nuclear receptors for COASTER the method is preferably to be used when the suspected disease relates to malfunction of a steroid receptor, or more preferably with a progestogen receptor, an estrogen receptor or a glucocorticoid receptor.
 - 10 The proteins for the invention can also be used to produce anti-bodies directed to these proteins, which antibodies can be used in diagnostic methods of disorders involving changes in the coactivation process disclosed in this invention.
 - 15 Methods for the production of monoclonal and polyclonal antibodies can be found in a standard laboratory manual such as Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl eds., John Wiley & Sons Inc.). Immunisation may be performed using crude or purified preparations of
 - 20 COASTER protein or via DNA vaccination using a mammalian expression vector for COASTER that is directly used to immunise the antibody donor organism.
- Poly-nucleotides encoding COASTER artificially incorporated in
- 25 eukaryotic cells, bacteria, plasmids or vectors and COASTER protein can be obtained by amplification by a polymerase chain reaction on a cDNA template that has been obtained by reverse transcription of RNA from human testis. The polymerase chain reaction should make use of a sense primer encompassing the start codon of the COASTER cDNA (e.g.
 - 30 ATGGGAGACCCGGGTCGGA; SEQ ID 13) and an antisense primer encompassing the stop codon of the COASTER cDNA (e.g. TTACATTTCCTCAAGACTTC; SEQ ID 14). Cloning of the thus obtained cDNA in a suitable expression vector will allow production of the COASTER protein.
 - 35 By deletions and insertions of nucleotides partially identical artificial COASTER proteins can be obtained with methods well known to the skilled person, for example as described in Sambrook (op. cit.).

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

12

The COASTER protein may be introduced into an organism by transfection of an expression vector containing the COASTER cDNA. The vector should contain a promoter that is able to drive gene expression in the transfected organism, and the COASTER cDNA downstream of this promoter. In addition, the vector should contain signals for proper initiation and termination of transcription and translation, and signals for proper processing of the transcript. For introduction of COASTER in mammalian cells viral promoters such as the Simian Virus 40, Rous Sarcoma long terminal repeat or Cytomegalovirus immediate early promoters are suitable for driving transcription of the COASTER cDNA. Examples of plasmid vectors containing viral promoters include pCDNA3.1, pRSV and pNGV1. In addition to introduction of COASTER into mammalian cells with the aid of plasmids, COASTER may be introduced into mammalian cells by transduction using viral vehicles for delivery and expression of COASTER. Suitable viruses include retroviruses, adenoviruses and baculovirus. For introduction of COASTER in bacterial cells vectors containing bacterial promoters such as the T7 promoter are suitable. Examples of bacterial expression vectors include pRSET and pET. For introduction of COASTER in yeast, suitable vectors include pYES for introduction in *Saccharomyces cerevisiae* and pPIC for introduction in *Pichia pastoris*.

A straightforward method is available to select a responsive nuclear receptor for the assay. For example, it can be tested whether a nuclear receptor is coactivated by COASTER protein in a transient transfection assay. When there is coactivation, the nuclear receptor is responsive. The action of a nuclear receptor is the induction of transcription of a gene linked down stream to a promoter. With a two-hybrid assay, for example, it can be tested whether the nuclear receptor interacts with the COASTER protein. Likewise, the functional equivalence to COASTER protein of an artificial protein can routinely be tested in an assay as described in the examples.

The following description of variants and use of the invention is intended to further enable the invention and the use of it.

Coactivation of the Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) liganded ER α depends on the AF1 region.

Figure 4 shows that COASTER is a coactivator for the 4OH-tamoxifen
5 liganded ER α but not for the 4OH-tamoxifen liganded ER β . These results
are in good agreement with previous observations that the SERM 4OH-
tamoxifen signals via the AF1 function of ER α . The AF1 function resides
in the AB domain of the ER α and is neither structurally nor functionally
10 conserved in ER β (McInerney et al., 1998, Endocrinology 139, 4513-
4522). To substantiate this notion, we tested the coactivating potential of
COASTER on two receptor chimeras. The ER β / α chimera contains the AB
domain of ER β fused to the CDEF domains of ER α as described
previously (McInerney et al., 1998, Endocrinology 139, 4513-4522). In
15 transfection experiments the ER β / α receptor permits coactivation by
COASTER in the presence of 17 β -estradiol, but not in the presence of the
SERMs 4OH-tamoxifen and raloxifene (Figure 8). This observation
indicates that coactivation by COASTER of the SERM liganded receptor is
distinct from coactivation of the 17 β -estradiol liganded receptor. In line
20 with the previous observation that signalling by 4OH-tamoxifen requires
the ER α AF1, our results show that 4OH-tamoxifen does not display
agonism on the ER β / α chimera. Furthermore, our data show that
elevating the COASTER levels in the cell cannot overcome this block in
activity, indicating that coactivation of the SERM liganded receptor
requires the ER α AF1. The situation on the ER α / β chimera, which
25 contains the ER α AF1 fused to the CDEF domains of ER β , is more
complex. It has been shown previously that the ER α / β chimera shows
agonism of 4OH-tamoxifen and an activity in the presence of 17 β -
estradiol that is reduced compared to that of the wild type ER α or ER β
receptors (McInerney et al., 1998, Endocrinology 139, 4513-4522). Our
30 data confirm and extend these results and show that in addition to 4OH-
tamoxifen and 17 β -estradiol, raloxifene is also able to signal via the
ER α / β chimera. However, the ER α / β chimera is insensitive to
coactivation by COASTER. The combined results indicate that the ER α / β
chimera adapts a unique conformation and suggest that the coactivation
35 as seen on the 17 β -estradiol-liganded wild type ER β depends on both the
AF2 function and sequences in the N-terminus of ER β .

COASTER identifies novel SERMs

The results presented in Figure 4 and 5 show that in the absence of COASTER, 4OH-tamoxifen may function as an agonist on ER α whereas raloxifene may not. Elevation of the COASTER levels in the cell allows the identification of raloxifene as a ligand with agonistic potential. We questioned whether COASTER would allow the identification of novel potential SERMs in a pool of compounds that have previously been identified as anti-estrogens. To this end, we tested the activities of the compounds ORG 43143, ORG 39660 and ORG 39669 that were identified as novel anti-estrogens in a high throughput screening assay (Method in Dechering et al., 2000, Current Medicinal Chemistry 7, 561-576). Figure 9 shows that these compounds all behave as anti-estrogens. Notably, compound ORG 39669 shows a partial activity in the anti-estrogenic assay. When tested in a COASTER co-activation assay, this group of anti-estrogens falls apart into three distinct functional classes (Figure 10). The first class comprises 4OH-tamoxifen and ORG 39669 and represents a group of compounds that show some agonism on ER α and enhanced agonism in the presence of COASTER. The second class is a group of anti-estrogens that are silent on ER α mediated transcription of an ERE reporter in the absence of COASTER. However, when COASTER levels are elevated, these compounds become agonists. The compounds raloxifene and the novel anti-estrogen ORG 43143 are representatives of this second class. The final class of anti-estrogens includes ICI 164,384 and ORG 39660 and represents a group of compounds that do not show agonism on an ERE reporter and remain silent in the presence of COASTER.

Tissue distribution of COASTER

The tissue distribution of COASTER mRNA was investigated by Northern blot analysis and RT-PCR. Human multiple tissue Northern blots were hybridized with a 794 bp COASTER cDNA fragment. Almost all tissues examined show hybridisation to an mRNA species of approximately 5 kB in size, with higher signals in testis, ovary, heart, placenta, and skeletal muscle, and lower to no signals in the other tissues (Figure 6). In addition, a very strong hybridisation signal is observed to a 4kB

transcript that is uniquely present in testis. The size of the 5 kB transcript is in good agreement with the size of the cDNA that we have isolated. The 4 kB transcript may represent a splice-variant. The testis specific expression pattern of this transcript is striking and suggests a

5 functional role in testis physiology.

Expression of mRNA from COASTER was also investigated by RT-PCR analysis in different human cell lines derived from tumors, and in RNA samples from human and *Macaca fasciculata* (*Cynomolgus* monkey) tissues. The semi-quantitative results of the RT-PCR are shown in figure 10 7 and 11. The results show high expression in the breast epithelial carcinoma cell lines MCF-7 and T-47 and the vaginal epithelial cell line SW954. Moderate expression was observed in the osteosarcoma cell lines U-2 OS and HOS, the endometrial epithelial carcinoma cell line Ishikawa, the vascular endothelial cell line VE103ER α , and the endothelial cell line 15 HS760T. No expression was detected in the osteosarcoma cell line MG63 and the endometrial epithelial carcinoma cell line ECC-1. The cell lines that show high expression of COASTER (MCF-7, T-47D, SW954) have been reported to contain high levels of ER α (Dechering et al., *Curr. Med. Chem.* 7, 561-576), suggesting that COASTER may contribute to ER α - 20 mediated growth of tumor cells. The RT-PCR results on RNA derived from tissues are presented in Figure 11. The RT-PCR method confirms the high expression in testis as revealed by the Northern blot (figure 6). In addition, high expression is seen in bone tissue. This indicates that ligands that allow the nuclear receptor-COASTER interaction might 25 influence bone metabolism.

Further examples and figures serve to illustrate and clarify or specify the invention.

The description is illustrated with the following figures:

30 **Figure 1.** Example of a nucleotide and amino acid sequence of COASTER. This COASTER cDNA sequence has a length of 4999 base-pairs with an open reading frame of 3039 base-pairs (1013 amino acids). A previously published sequence of the cDNA encoding KIAA0576 (accession number AB011148) with near complete homology (99%) shows an insertion of 144 35 nucleotides at position 2832 that results in an open reading frame of 1061 amino acids. Zinc finger motifs are shown in bold, an LXXLL motif is underlined. The amino acid sequence of a consensus nuclear

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

16

localisation signal is shown in *italics* and underlined. The ATG start codon and in-frame translational stop codons are shown in **bold** and *italics*.

Figure 2. The COASTER cDNA sequence encodes a protein of approximately 115 kiloDaltons. Template pCDNA3.1HISC.COASTER that contains the complete open reading frame of COASTER was *in vitro* transcribed and translated in the presence of [³⁵S]-methionine. As a control, pBK-SRC-1 (Onate et al., Science 270, 1354-1357) was transcribed and translated in parallel. Labeled proteins were analyzed by SDS-PAGE. The figure shows an autoradiograph of the electrophoresis pattern. Lane 1: translation product of pBK-SRC-1. Lane 2: translation product of pCDNA3.1HISC.COASTER. The position of the COASTER protein is indicated with an arrow.

Figure 3. Hormone dependent interaction between ER β and COASTER. A yeast two-hybrid assay was performed in yeast host strain AH109 that was transformed with plasmid pGBT9.ER β and a plasmid encoding a fusion between a GAL4 activation domain and COASTER amino acids 1-234. The figure shows β -galactosidase activity of the transformed yeast cells in response to 10^{-8} M 17 β -estradiol (hatched bar) and 10^{-5} M raloxifen (solid bar). The background β -galactosidase activity of the transformed yeast cells is indicated with an open bar.

Figure 4. Differential coactivation of ER α and ER β in response to 4OH-tamoxifen and raloxifen. U-2 OS cells were transiently transfected with p4ERE-TATA-LUC and pNGV1.ER α or pNGV1.ER β as indicated. Where indicated, cells were cotransfected with COASTER expression constructs pCDNA3.1HISA.COASTER α or pCDNA3.1HISC.COASTER, or with expression construct pCDNA3.1HISC.GRIP1. The figure shows luciferase activity (l.a.) following incubation of the cells with no hormone (open bars), 10^{-7} M raloxifen (hatched bars) or 10^{-7} M 4OH-tamoxifen (solid bars). Error bars indicate the standard deviations in a triplicate experiment.

Figure 5. Dose-dependent activation of an estrogen-response element in the presence of ER α or ER β in combination with COASTER. U-2 OS cells were transiently transfected with p4ERE-TATA-LUC and pNGV1.ER α . Transfection experiments indicated with solid markers were supplemented with COASTER expression construct pCDNA3.1HISC.COASTER. The figure shows luciferase activity (l.a.)

following incubation of the cells with an increasing concentration of raloxifen (indicated with squares) or 4OH-tamoxifen (indicated with triangles). Error bars indicate the standard deviations in a triplicate experiment.

- 5 **Figure 6.** Tissue distribution of COASTER transcripts. Human multiple tissue Northern blots were hybridised with a [³²P]-labeled COASTER cDNA probe. The figure shows an autoradiograph of the blots. The COASTER probe hybridises to two mRNA species of approximately 5 kB and 4 kB in size, indicated with arrows. The tissues represented on the
- 10 blots include spleen (a), thymus (b), prostate (c), testis (d), ovary (e), small intestine (f), colon (g), peripheral blood leukocytes (h), heart (i), brain (j), placenta (k), lung (l), liver (m), skeletal muscle (n), kidney (o) and pancreas (p). The migration pattern of a size standard is indicated at the left side of the figure (size in kilobases).
- 15 **Figure 7.** COASTER expression in tumor cell lines. The relative expression levels of COASTER was determined by RT-PCR. The figure shows relative intensity of the PCR products as measured by scanning of the agarose gel electrophoresis images of the PCR products. The cell lines represented include: MCF-7 (a), T-47D (b), U-2 OS (c), MG63 (d), HOS (e),
- 20 ECC-1 (f), Ishikawa (g), VE103 (h), HS760T (i) and SW 954 (j).
- Figure 8.** Luciferase expression quantified with light counts per second (cps) in cells transfected with an ER β / α chimeric receptor and COASTER in response to addition of estradiol (E2), raloxifene or 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT).
- 25 **Figure 9.** Percentage estrogenic activity in response to addition of a standard dose of estradiol in the presence of various concentrations, expressed as logarithm of the concentration, of raloxifene, 4-hydroxy tamoxifen (4OHT), ICI 164,384, Org 43143, Org 39660 and Org 39669, respectively.
- 30 **Figure 10.** Effect of compounds in a COASTER coactivation assay.
- Figure 11.** COASTER expression in human and *M. fasciculata* tissues. The relative expression levels of COASTER were determined by RT-PCR. The figure shows relative intensity of the PCR products as measured by a Taqman real-time quantitative PCR method. The tissues that served as
- 35 the source for the RNA material are indicated at the bottom of the figure. All tissues were from human origin, except for the bone tissue which was derived from *M. fasciculata*.

Examples

Identification of a novel coactivator for steroid receptors

Results and discussion5 *Yeast Two Hybrid screen*

For identification of COASTER as protein that interacts with ER α in a hormone dependent way, a yeast two-hybrid screen was performed using ER β as bait. The two-hybrid system consisted of a yeast strain (AH109) that expressed the *HIS3*, *MEL1*, *ADE2* and *lacZ* reporter genes from a GAL responsive promoter. ER α was expressed in this strain in a fusion with a GAL4 DNA binding domain. In this system, ER β alone is not able to activate the reporter genes in the presence of 17 β -estradiol (results not shown). The ER β expressing host strain was transformed with a human osteosarcoma cDNA library. This library expresses cDNA as a translational fusion with a GAL4 transactivating domain. Interaction between ER β and a library encoded protein permits activation of the reporter genes and growth on media lacking histidine and/or adenine. A total of 3.5x10⁶ colonies were screened. The transformed yeast cells were selected for growth on media lacking histidine and in the presence of 17- β -estradiol. 560 *HIS*⁺ colonies were selected and screened by replica plating on their *ADE*⁺ phenotype in the absence or presence of 17- β -estradiol. 27 Yeast transformants that showed a hormone dependent *HIS*⁺, *ADE*⁺ phenotype were selected. The library-derived plasmid DNA was isolated from these 27 clones, and re-introduced in the AH109.pGBT9.ER α host yeast strain to verify that the observed phenotypes were dependent on the transformed DNA. In a yeast β -galactosidase (*lacZ*) transactivation assay, 21 out of the 27 positives that were retested showed a hormone inducible *lacZ*⁺ phenotype. Sequence analysis of these positives identified two well-known coactivators for steroid receptors, UBC9 (ubiquitin conjugating enzyme) and SUG1. In addition, a cDNA sequence was identified that was predicted to encode for a nuclear protein with several zinc finger motifs and an LXXLL domain, which apparently is implicated in the interaction between steroid receptors and coactivators. This cDNA was selected for further study and proved to encode a functional coactivator for steroid receptors. We have, therefore, termed this novel coactivator COASTER.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

19

COASTER: a novel coactivator for steroid receptors*Primary structure of COASTER*

The insert of plasmid pACT2.COASTER Δ that was isolated in the two-hybrid screen was sequenced, and this sequence was compared with the Incyte Lifeseq Gold and Genbank databases using the BLAST algorithm. A total of 270 Incyte EST sequences were identified. Clone 2905757, containing the 3' end of the COASTER cDNA, was obtained from Incyte Genomics (Palo Alto, USA) and sequenced entirely. In addition, searching of the Genbank database revealed that the COASTER sequence shares near complete homology (99%) with the gene encoding KIAA0576, a putative protein of unknown function (Nagase et al., DNA Res. 5, 31-39). The KIAA0576 sequence represents a splice-variant of COASTER and contains an in-frame insertion of 144 base pairs. RACE PCR was employed to identify the 5' end of the COASTER cDNA sequence. Two distinct fragments that differ in their 5' untranslated regions were identified. Figure 1 shows an overview of the complete COASTER cDNA sequence. The cDNA corresponding with the longest RACE fragment has a length of 4099 nucleotides and contains an open reading frame of 3039 nucleotides (1013 amino acids). The KIAA0576 shows an insertion of 144 nucleotides at position 2832 that results in an open reading frame of 1061 amino acids. For both COASTER and KIAA0576, the amino acid sequence deduced from the cDNA predicts a protein that contains 9 zinc finger domains (C2H2 type), a nuclear localization site and an LXXLL nuclear receptor interaction motif.

The COASTER cDNA encodes a protein

To test whether the COASTER cDNA indeed encoded a protein, plasmid pCDNA3.1HISC.COASTER that contains the complete open reading frame of COASTER (amino acids 1-1013) was *in vitro* transcribed and translated. Figure 2 shows that a protein of approximately 115 kiloDaltons is encoded by the COASTER cDNA. The observed size of the protein is in perfect agreement with the length of the cDNA sequence presented in Figure 1. The results furthermore show that the COASTER cDNA encodes a protein that is distinct from the protein encoded by pBK-SRC-1, which contains the open reading frame for the known coactivator SRC-1.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

20

COASTER interacts with ER β in yeast

Plasmid pACT2.COASTERA was originally isolated in the yeast two-hybrid screen. To verify that the protein encoded by this plasmid indeed interacts with ER β in yeast, plasmid pACT2.COASTERA was re-introduced into the AH109.pGBT9.ER β recipient strain. Figure 3 shows the results of a subsequent two-hybrid assay. The results show that addition of 17 β -estradiol to the growth medium results in a dose-dependent induction of the β -galactosidase reporter activity. In contrast, the anti-estrogens raloxifen is not able to induce the activity of the reporter. This failure may relate to the resistance of yeast cell to anti-estrogens as has been reported earlier (Lytle et al., J Steroid Biochem. Biol. 42, 677-685; IH, unpublished results). Alternatively, it may indicate that the anti-estrogen induced conformation of ER β does not permit an interaction with COASTER. Transformation of the yeast strain with either the ER β expression plasmid or the COASTER expression plasmid alone did not result in a 17 β -estradiol inducible *lacZ*⁺ phenotype (data not shown). Together, the results indicate that ER β and COASTER interact in a 17 β -estradiol-dependent manner in yeast. The interaction is independent of the LXXLL motif of COASTER as this motif is not encoded by plasmid pACT2.COASTERA that was used in the yeast two-hybrid assay.

COASTER is a functional coactivator in mammalian cells

To test the functional role of COASTER in a mammalian setting, the full length COASTER (amino acids 1-1013) cDNA was cloned in a mammalian cell expression vector. The functional role of COASTER was analyzed by cotransfection of U-2 OS cells with the COASTER expression plasmid in combination with a steroid receptor expressing plasmid, and a plasmid containing a luciferase reporter gene under control of a hormone responsive element. Following transfection, cells were stimulated with the appropriate hormone for the receptor under study. The results are presented in Table 1:

Table 1

Test cells		no hormone	10 ⁻⁸ M 17 β -estradiol	10 ⁻⁸ M ICI 164,384
1	ER β	150 $\pm$ 14	500 $\pm$ 109	134 $\pm$ 28
	ER β +COASTER	133 $\pm$ 16	8200 $\pm$ 819	101 $\pm$ 6
2	ER α	180 $\pm$ 22	9505 $\pm$ 2122	174 $\pm$ 18
	ER α +COASTER	134 $\pm$ 18	15400 $\pm$ 1179	275 $\pm$ 55
			10 ⁻⁸ M Org 2058	
3	PR	62 $\pm$ 22	822 $\pm$ 112	
	PR+COASTER	81 $\pm$ 48	3229 $\pm$ 683	
			10 ⁻⁸ M Dexamethasone	
4	GR	44 $\pm$ 3	1232 $\pm$ 82	
	GR+COASTER	103 $\pm$ 33	35245 $\pm$ 8679	

Legend to Table 1: COASTER is a coactivator for steroid receptors. U-2 OS cells were transiently transfected with pNGV1.ER β and p4ERE-TATA-LUC (1), pNGV1.ER α and p4ERE-TATA-LUC (2), pKCRE.PR and pMMTV-LUC (3) or pNGV1.GR and pMMTV-LUC (4). Where indicated, COASTER expression construct pCDNA3.1HISC.COASTER was added to the transfection mixture. Following transfection, cells were incubated with the hormones indicated in the top row. The table shows luciferase activities $\pm$ standard deviations from a triplicate experiment. Org 2058=16 α -ethyl-21-hydroxy-19-norpregn-4-ene-3,20-dione.

As can be seen in table 1, COASTER is a coactivator for the progesterone receptor (PR), glucocorticoid receptor (GR) and the estrogen receptors α and β (ER α and ER β). In all cases, the activity of the receptor liganded with an agonist is further enhanced by co-expression of COASTER. When ER α or ER β are liganded with the antagonist ICI164,384, co-expression of

COASTER does not enhance the transcriptional activity, indicating that the antagonist induced conformation does not allow COASTER to function as a coactivator. The activity of the reporter gene was not induced when COASTER was transfected in the absence of a steroid receptor (data not shown), indicating that both the steroid receptor and COASTER are required for the enhanced activity.

COASTER identifies partial agonists for the estrogen receptor α

The coactivating potential of COASTER on ER α and ER β was further studied in the presence of the anti-estrogens raloxifen and 4OH-tamoxifen. For comparison, the activity of the coactivator GRIP1, which is the mouse orthologue of human TIF2/SRC-2, was analyzed in parallel. Transfection-experiments showed that in U-2 OS cells, 4OH-tamoxifen acts as an agonist on the transcriptional activity of ER α , but not ER β , when an ERE-reporter is used as a read-out (Figure 4). Cotransfection of either COASTER or GRIP1 results in an enhanced activity of the 4OH-tamoxifen-liganded ER α . Interestingly, COASTER is able to activate transcription in the presence of raloxifen, which compound is otherwise not an agonist in this system. This phenomenon is observed on ER α -mediated transcription, but not when ER β is present as the estrogen receptor. Moreover, the coactivator GRIP1 is not able to activate expression of the reporter gene in the presence of raloxifen and ER α . The data show that the activity of the truncated form of COASTER, COASTER Δ , is identical to that of full length COASTER. This indicates that amino acids 1 to 234 are sufficient for the coactivating potential of COASTER on the raloxifen or 4OH-tamoxifen liganded ER α .

The effects of COASTER on ER α mediated transcription were further studied by making dose-response curves for the ligands raloxifen and 4OH-tamoxifen in the presence and absence of COASTER. The data presented in Figure 5 confirm the observation that raloxifen acts as an agonist on ERE-driven gene transcription in the presence of ER α and COASTER. When COASTER is omitted, raloxifen is not able to activate the reporter gene, even at high concentrations of the ligand. The anti-estrogen 4OH-tamoxifen is an agonist in this system. However, the expression of COASTER increases the magnitude of the transcriptional response. For both compounds, the activity of the reporter in the

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

23

presence of ER α and COASTER is dependent on the concentration used in the assay.

The results presented here show that COASTER can influence the agonist/antagonist balance of mixed profile anti-estrogens such as raloxifen and 4OH-tamoxifen. Previous reports have shown that raloxifen may act as an agonist via non-classical (non-ERE) pathways on ER β (Zou et al., Mol Endocrinol. 13, 418-430; Paech et al., Science 277, 1508-1510). To the best of our knowledge, these data provide the first observations of agonism of raloxifen on the classical estrogen-responsive element (ERE) pathway. In addition, these are the first indications that raloxifen may act as an agonist on ER α . These observations are important to our understanding of the mechanisms of action of anti-estrogens. The property of COASTER to activate the raloxifen-liganded ER α sets COASTER apart from the coactivators, such as GRIP1, described to date. Moreover, the assay described here can be used with particular advantage for the pharmacological screening of novel estrogen receptor ligands as COASTER is able to identify partial agonistic properties of compounds.

20 Tissue distribution of COASTER

The tissue distribution of COASTER mRNA was investigated by Northern blot analysis and RT-PCR. Human multiple tissue Northern blots were hybridized with a 794 bp COASTER cDNA fragment. Almost all tissues examined show hybridisation to an mRNA species of approximately 5 kB in size, with higher signals in testis, ovary, heart, placenta, and skeletal muscle, and lower to no signals in the other tissues (Figure 6). In addition, a very strong hybridisation signal is observed to a 4kB transcript that is uniquely present in testis. The size of the 5 kB transcript is in good agreement with the size of the cDNA that we have isolated. The 4 kB transcript may represent a splice-variant of which the detailed structure is as yet unknown. However, the testis specific expression pattern of this transcript is striking and suggests a functional role in testis physiology.

Expression of mRNA from COASTER was also investigated by RT-PCR analysis in different human cell lines derived from tumors. The semi-quantitative results of the RT-PCR are shown in figure 7. The results show high expression in the breast epithelial carcinoma cell lines MCF-7

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

24

and T-47 and the vaginal epithelial cell line SW954. Moderate expression was observed in the osteosarcoma cell lines U-2 OS and HOS, the endometrial epithelial carcinoma cell line Ishikawa, the vascular endothelial cell line VE103ER α , and the endothelial cell line HS760T. No expression was detected in the osteosarcoma cell line MG63 and the endometrial epithelial carcinoma cell line ECC-1. The cell lines that show high expression of COASTER (MCF-7, T-47D, SW954) have been reported to contain high levels of ER α (Dechering et al., Curr. Med. Chem. 7, 561-576), indicating that COASTER can contribute to ER α -mediated growth of tumor cells.

Materials and Methods

Yeast Two Hybrid screen.

Yeast media

Yeast host strains and transformants were cultured in complete medium (YPD) or in minimal Synthetic Dropout (SD) medium. The complete medium is a blend of peptone, yeast extract, and dextrose in optimal proportions for growth of yeast strains (see yeast protocols handbook Clontech, Palo Alto, USA, protocol PT3024-1). The minimal SD medium contains 2% dextrose, 0.67% yeast nitrogen base, and a specific mixture of amino acids and nucleosides (e.g. SD-His-Leu-Trp is a medium that lacks histidine, leucine and tryptophan). All these media were purchased from BIO101 (Beverly, USA).

Two-hybrid screen

Saccharomyces cerevisiae strain AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{TATA}-lacZ) was obtained from Clontech, Palo Alto USA. To express the ER β protein as a bait in yeast strain AH109, plasmid pGBT9.ER β was used (kind gift of W. Kruijer, Rijksuniversiteit Groningen, The Netherlands). This plasmid contains the coding sequence of ER β (amino acids 1 to 530) fused to a sequence encoding a GAL4 DNA binding domain and contains the *TRP1* gene as a selectable marker. The yeast strain AH109 was transformed with pGBT9.ER β , using a standard lithium-acetate method following the instruction manual from Clontech (Palo Alto, USA, protocol#PT3247-1) and transformants were selected on SD-Tryptophan (SD-Trp) plates.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

25

From this plate single colonies were selected and stored as parental clones. Subsequently, the *HIS3* background expression of these clones was determined by plating on the appropriate selection plates. Clones that grew on histidine-deficient media in the presence of 17 β -estradiol were discarded. Subsequently, clones with low *HIS3* background expression were transformed with a positive control pGRIP1 (kind gift of M. Stallcup, University of Southern California, USA), a plasmid that encodes the coactivator GRIP1 that has been shown to interact with the estrogen receptor in yeast (Hong et al., Mol. Cell. Biol. 17, 2735-2744).

10 The parental clone (AH109.ER β) that showed high *HIS3* expression in the presence of pGRIP1 and 17 β -estradiol was subsequently chosen as the recipient clone for screening of the library. A human osteosarcoma Matchmaker cDNA library was obtained from Clontech (Clontech, Palo Alto, USA, cat.#: HL4026AH). This library is constructed in vector pACT2, which contains a *LEU2* gene as a selectable marker and expresses the cloned inserts in fusion with a GAL4-activation domain (AD). Recipient clone AH109.ER β was transformed with 100 μ g plasmid DNA from the osteosarcoma cDNA library. Transformants were selected on SD-Trp-Leu-His plates containing 10⁻⁸ M 17 β -estradiol, and *HIS*⁺ colonies were

20 identified. *HIS*⁺ colonies were rescreened by replica plating on SD-Trp-Leu-His-Ade media in the absence and presence of 10⁻⁸ M 17 β -estradiol. Yeast transformants that showed a hormone dependent *HIS*⁺/ADE⁺ phenotype were selected for subsequent studies. From these transformants, DNA was isolated following a protocol for crude miniprep isolation (see basic protocols Y1.4). The crude miniprep was used to transform *E. coli* KC8 by electroporation and transformants containing the library-derived plasmid were selected on leucine deficient medium. Library inserts were sequenced on an ABI sequencer from Perkin Elmer (Norwalk, USA). Blast similarity searches were performed against the

30 Incyte database.

Chemiluminescent Reporter Gene assay for β -galactosidase in yeast:
A single colony was cultured in liquid SD-Trp-Leu medium overnight at 30°C. These overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in 90 μ l SD-Trp-Leu medium in a 96-well culture plate. 10 μ l of a 10 times concentrated hormone stock solution were added and plates were incubated for 5 hours at 30°C and under vigorous shaking at 200 rpm.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

26

Subsequently, β -galactosidase activity was measured using the One-Step Yeast Lysis buffer and Galacton Plus chemiluminescent detection system of Tropix (Tropix, Inc., Avenue, Bedford, USA). Light emission was monitored using a Victor Instrument (Perkin Elmer, Norwalk, USA).

- 5 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA ends) of COASTER:
To isolate the 5' end of the COASTER cDNA, 5'RACE-PCR experiments were performed using Human testis Marathon-Ready cDNA (Clontech, Palo Alto, USA, Cat.# 7414-1). RACE PCR was performed using a
10 Marathon cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, USA) in combination with gene specific primer CCAGACACCCACGTGTGGCC following instructions of the manufacturer. Two distinct fragments (~650bp and ~800 bp) were obtained. The fragments were isolated from an agarose gel, purified using Quiaquick spin column (Qiagen, Valencia,
15 USA) and cloned using the pCR2.1TOPO kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Colonies containing inserts were identified by colony PCR using gene specific primers CCAGACACCCACGTGTGGCC and AAGCCACCATGGACAGCAGGAGCAGTGGTG. Sequence analysis of positive clones was performed on an ABI sequencer (Perkin Elmer,
20 Norwalk, USA).

Recombinant plasmids:

- Initially, a plasmid encoding a truncated form of COASTER (pACT2.COASTERA, amino acids 1-234) was isolated in the yeast two
25 hybrid screen. The insert from this plasmid was cloned in the mammalian cell expression vector pCDNA3.1HISA (Invitrogen, Carlsbad, USA) to yield plasmid pCDNA3.1HISA.COASTERA. A plasmid containing the 3' end of the COASTER cDNA was obtained from Incyte Genomics (Palo Alto, USA). This plasmid (Incyte clone ID 2905757) was digested
30 with *SacI*/*NotI* (amino acid 330 to 1061). The 5' end of the COASTER (amino acid 1 to 332) was amplified by PCR on human-testis Marathon Ready cDNA (Clontech, Palo Alto, USA, cat.#7414-1) using primers CTAGGTACCGACAGCAGGAGCAGTGGTGC (SEQ ID 15) and GGCAGTGAGCTCCATGTGGG (SEQ ID 16) (restriction sites are
35 underlined). The resulting PCR product was digested with *KpnI* and *SacI* and ligated together with the *SacI*-*NotI* restriction fragment into the *KpnI*-*NotI* restricted pCDNA3.1HISC vector (Invitrogen, Carlsbad, USA). The

latter plasmid was termed pCDNA3.1HISC.COASTER. For transfection studies, the protein coding regions of the cDNA's for the human estrogen receptors α and β and the glucocorticoid receptor, were inserted into the mammalian expression vector pNGV1 (accession number X99274). The protein coding region of the progesterone receptor was inserted into the mammalian expression vector pKCRE (Stam et al., Eur.J.Pharmacol.227,153). The reporter plasmid pMMTV-LUC was constructed by modification of vector pManMneoLUC (Clontech, Palo Alto, USA). The neomycin cassette was removed by digestion with endoR *HindIII/BamHI*, followed by blunting with Klenow polymerase, and ligation by T4 DNA ligase. The reporter vector 4ERE.TATALuc contains a luciferase gene under control of four estrogen-response elements (ERE) and was a gift from P. v.d. Saag (Nederlands Instituut voor Ontwikkelingsbiologie, Utrecht, The Netherlands). A mammalian expression plasmid for GRIP1 was constructed by restriction digestion of pGRIP1 (kind gift of M. Stallcup, University of Southern California, USA) with *EcoRI* and *BamHI*. The resulting fragment was ligated into a *EcoRI/BamHI* digested pCDNA3.1HISC vector to yield plasmid pCDNA3.1HISC.GRIP1.

20

Cell culture and transient transfection:

U-2 OS cells were obtained from ATTC (HTB-96) and maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂) as a monolayer culture in phenolred-free M505 medium. The latter medium consists of a mixture (1:1) of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco BRL,Breda, the Netherlands) and Nutrient Medium F12 (Ham's F12, Gibco BRL,Breda, the Netherlands) supplemented with 2.5 mg/ml sodium carbonate, 55 µg/ml sodium pyruvate, 2.3 µg/ml β -mercaptomethanol, 1.2 µg/ml ethanalamine, 360 µg/ml L-glutamine, 0.45 µg/ml sodium selenite, 62.5 µg/ml streptomycin, and 5% charcoal-treated bovine calf serum (Hyclone). 1.10⁵ cells were seeded in 24-wells tissue culture plates and DNA was introduced by use of lipofectin (Gibco BRL,Breda, the Netherlands). To this end, plasmid DNAs in 62.5 µl Optimem (Gibco BRL Breda, the Netherlands) was mixed with an equal volume of diluted lipofectin reagent (1.75 µl lipofectin in 62.5 µl Optimem) and allowed to stand at room temperature for 30 min. After washing the cells once with serum-free M505 medium, 250 µl Optimem together with the DNA-

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

28

lipofectin mixture was added to the cells. After incubation for a 5 hour period at 37°C (5% CO₂) cells were washed once with M505 medium supplemented with 5% charcoal-treated bovine calf serum and hormones were added to the medium. Cells were incubated overnight at 37°C. The next day, cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS) and cell extracts were made by addition of 75 µl lysisbuffer (0.1 M phosphate buffer pH 7.8, 0.2% Triton X-100). After incubation for 5 min at room temperature, a 30 µl aliquot was added to 50 µl luciferase assay reagent (Promega; Wisconsin, USA). Light emission was measured using a Victor Instrument (Perkin Elmer, Norwalk, USA).

Northern blot analysis:

Plasmid pCDNA3.1HISA.COASTERA was digested with *EcoRI* and *XbaI* to generate a probe (nucleotides 183-928). The DNA fragment was labeled with [α^{32} P]dCTP with Ready-To Go DNA labeling beads following instructions of the manufacturer (Pharmacia). Human multiple tissue northern blots (Clontech, Palo Alto, USA, cat.# 7760-1 and 7759-1) were hybridized with the α^{32} PdCTP-labelled DNA fragment (see basic protocols R1.5). Northern blots were washed using the following washing conditions: 2x 30 min. 2XSSC/0.1% SDS at 65°C and 1x 15 min. 1xSSC/0.1%SDS at 65°C.

RT-PCR analysis of COASTER expression in cell lines:

cDNA was made using 2 µg of total RNA, isolated from a number of human cell lines using RNazol B (Cinna/Biotech), using the SuperscriptII kit (BRL). A portion of cDNA was used for specific PCR amplification of COASTER (primers sense TGAGGCATCTGAGTCAACA and anti sense CGAGCCAGAGTTAAAGCA. After 20, 25, 30 and 35 PCR-cycles, samples were taken. The PCR samples were analyzed on 1.5% agarose gels. Gel images were quantified with Imagequant 5.0 (Molecular dynamics).

In vitro translation:

A TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Madison, USA, cat.#L5020) was used for *in vitro* transcription/ translation of COASTER from a pCDNA3.1HISC.COASTER template in the presence of [35 S]-methionine following instructions provided with the lysate. A fragment of SRC-1 encoded by plasmid pBK-SRC-1 (Onate et al., Science 270, 1354-

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

29

1357) was analyzed in parallel as a control. Labeled proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

30

Claims

1. A protein, characterised in that the protein is selected from the group:
 - A) a protein having an amino acid sequence as in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12 or the sequence of amino acid number 1-234 in SEQ ID's 7 or 8
 - 5 B) a protein having an amino acid sequence which has at least 90% similarity to the sequence in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12
 - C) a protein having an amino acid sequence which has at least 90% similarity to the sequence of amino acid number 1-234 in SEQ ID's 7 or 8
 - 10 D) a protein which is a naturally occurring variant of a protein having the sequence as in SEQ ID's 7, 8, 11 or 12
 - E) a protein which is a homologous functional equivalent of a protein defined under A, B, C or D.
- 15 2. Use of a polynucleotide encoding the protein according to claim 1 by bringing the polynucleotide into expression in a system which also comprises a responsive nuclear receptor.
3. The use according to claim 2 in an assay for binding of the protein with the responsive nuclear receptor.
- 20 4. The use according to claim 2 or 3, characterised in that the responsive nuclear receptor is a progestogen receptor, an estrogen receptor or a glucocorticoid receptor.
5. A system in which a polynucleotide is introduced and can be brought into expression and further comprising a responsive nuclear receptor, characterised in that the polynucleotide encodes the protein according to claim 1.
- 25 6. A method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator in a system, comprising the addition of an agent to the system, which agent interferes with, or enhances, the function of the coactivator, characterised in that the coactivator is a protein according to claim 1.
- 30 7. The method according to claim 6, characterised in that the method is an in vitro assay for determination of the degree of modulation and comprises quantifying the degree of modulation.
- 35 8. The method according to claim 6, characterised in that the system in which the agent interferes with, or enhances, the function of the coactivator is a cell within a human or animal body.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

31

9. The method according to anyone or more of claims 6-8, characterised in that the responsive nuclear receptor is a progestogen receptor, an estrogen receptor or a glucocorticoid receptor.
10. A pharmaceutical composition for use in the method according to
5 claim 8, which pharmaceutical composition comprises the agent which interferes with, or enhances, the function of the coactivator.
11. A method for diagnosis of responsive nuclear receptor-related diseases comprising testing for quantitative hybridisation with RNA with a labelled polynucleotide or fragments thereof, characterised in
10 that the polynucleotide has a sequence that is having at least 90% homology with one or more of the sequences from the list consisting of SEQ ID's 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 and 10.

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 1

```

-->RACE fragment 1
5  GGRAGCCCGGAGTACAGAGAAAGCGGCTCCGGGGGCTAGCGGGCCAGTAAGGGCCGCTC
181  CTCTCTTGAAGAGSTTTTGCGTCTCTTTCCGCGGTGGCGTCCGCGCTCAGCGAGGGGCG
-->RACE fragment 2
121  GGTCCCGGTAGCGCCAGGCGGTGCGAGGCGGGAGGGGATTCGTGGCGAGCGCGCGGCA
181  AGGGACAGCAGGAGCAGTGTGTCTCTCAGCGCGCGCTCGGAGACATGGGAGACCCGGGG
1  M G D P G
10 241  TCGGAGATAATAGAATCTGTCCCTCCAGCTGGCCCTGAGGCATCTGAGTCAACACGGAT
241  S E I I E S V P F A G P A S E S T T D
301  GAAATGAGACGACATTCAGTTTCTCAGTGAAAGACCATTAAGCTTGTCTTGAATAC
26  E N E D D I Q F V S E G P L R P V L E Y
361  ATTGATCTGGTCAGCAGTGATGATGAAGAGCTAGCACCTCTTATCTGATGAGAAATAT
46  I D L V S S D D E E P S T S Y T D E N I
421  AAAAGTAAAGACCATATTGATTATCAGAAAGGATAAGTTGGTTTAACTCTGGCTCGTCTA
66  K R K D H I D Y Q K D K V A L T L A R L
481  GCGCGCCATGTTGAAGTGGAGAAACAGCAGAAAGAGAGAAATAGAGCATTCAGAGAA
86  A R H V E V E K Q Q K E E K H R A F R E
20 541  AAAATTGATTTTCAAGTGTCTCAGTGTGTAAGGATTTGAATTTATTCAGAGGACATTC
106  E I D F Q H A H G L Q E L E F I R G H S
601  GATACAGAGCAGCAGAGACTGTGTGTGGACAGTGGTAAAAATGCCAGGACTCAAAACA
126  D T E A A R L C V D Q W L K M P G L K T
661  GGCACATTTAATTGTGGACAAAAGTTCAATTCGAAAGAGAGGCCACACGTGGGTGTCT
25 721  G T I N C G T K S S F R R R G G H T W V S
721  GGGAAACCACTTTATGTTCTATATGACCTGTAACAGGAGTTTGCAATGGGACCTT
166  G K P T L C P I M H C N K R F D N G H L
186  CTCTTAGGACATTTGAAGAGGTTCAGTCACTCTCCATGTGATCCAAACATTAACATACAT
30 841  GGACCTTTCTCAGCTCCTTGTGTGTAGTATGTTATAAAATTTGTTACTCAACAA
206  G P F F S S F A C V V C Y K K F V T Q Q
901  CAATATAGAGATCACCTTTTGAAGGAGGCCACAGATGATGGACATAACAACACCTT
226  Q Y R D H L F D K E A T D D G H N N N L
961  CTTCTCAGATTATTCAGTGTGTTGATGTCGAATGCTTCTTCTTTTAGCAGAAAG
35 1021  L F Q I I Q C F A C P N C F L L F S E K
246  GGGAGTGTTCAGAGCATATGCTGGAAGAAATCAITTCATCAGAGTTTCAAACTGGG
266  S E C S K H M S G K N H F H Q S F K L G
1081  GATAACAAAGGAATTGCACATCCATATCTTTCCATCTTTTGCAAGAACTTTTGATC
296  D N K G I A H P I S F P S F A K K L L I
40 1141  TCTCTGTGCAAGATGTTCCCTTTCAAGTTAAGTGTGTGGCTGCCACAGACACTGGGT
306  S L C K D V P F Q V K C V A C H K T L R
1201  TCCACATGGAGCTCACTGCCCATTTCAGAGTTCATTGTGGAATGCTGGACCTGTAGCT
326  S H M E L T A H F R V H C P N A G P V A
1261  GTAGCTGAGAGAGCATTAACAGAGTTGACAGAAATTCATATTAGAGGTATTGTCCA
45 346  V A E K S I T Q V A E K F I L R G Y C P
346  GATTGCAATCAAGTCTTTGTGGATGAACACAGCACCCAAATCATAGCAGAAATCAGGA
1321  D C N Q V F V D E T S T Q N H K Q N S G
366  CACAAAGTCCGAGTCATTAACTCAAGTGAAGATCAGTCTTACTCTATTGCCACAGCAGC
1381  H K V R V I N S V E E S V L L L Y C H S S
386  GAGGGAGACAGAGATCCTTCTCTGACTTGCATTTATTGTTGGATCANTCAAAATTTCA
50 1441  E G N K D P S S D L H L L L D Q S K F S
406  TCACTTAAGAACCATGCTATTAAGAAATCTAGCTCACGAGGAGTCATTGCCATTCCA
1501  S L K R T M S I K E S S S L E C I A I P
426  AAAGAAGAGTGAATTTAAAGATAAAAGCCATGAAGGTGTTGCTTGTGTCCGAAGAA
1561  K K K M N L K D K S H E G V A C V Q K E
55 446  AAATCAGTAGTTAAACCTGTTCTGTGAATGCAATCAGCGATTCCAAAGTGAAGATGCA
1621  K S V V K T W F C E C N Q R F P S E D A
466  GTAGAAAGAGCTGTTTCTCAGCAACACATGGGTTATAAGTGTGTGTGTGTGTGAAG
1681  V E K H V F S A N T N G Y K C V V C G K
486  GTATGTGATGATTCAGGGGTTCATTCGTTTACACATGAGCCGGATTACGGAGGGGCACAT
60 1741

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 1 continued

```

506      V C D D S G V I R L H M S R I H G G A H
1801    T T A A T A A C T T C T T T C T G T G T G G A C A T G C A A A A G G A G T T A C A G G A A G A T A C T
526      L N N F L F W C R T C K K E L T R K D T
1861    A T C A T G G C A C A T G T G A C T G A A T T C A T A A T G G A C A C A G A T A T T T T A T G A G A T G G A T G A G
546      I M A H V T E F H N G H R Y F Y E M D E
1921    G T A G A A G G T G A A A C T T T G C A T C A T C C T C T A C A C A T T G G A T A A T T G A C T G C T A C A A G
566      V E G E T L P S S S T T L D N L T A N K
1981    C C T T C A T C A G C A T T A C T G T A T T G A T C A T T C C C G G C A A T A G T T C T C G A G G G T A A A
586      F S S A I T V I D H S P A N S S P R G K
2041    T G G C A A T G C C G A T T T G T C A A G A T A T G T T G A T T C C C A G G A A T G T T A A A C A G C A C T G C
606      W Q C R I C E D M F D S Q E Y V K Q H C
2101    A T G T C T T T G G C A A G C A C A A G T T T C A T A G A T A C A G C T G T G C T C A C T G C A G A A A G C C T T T
626      M S L A S H K F H R Y S C A H C R K P F
2161    C A T A A G A T A G A A A C A T T G T A C C G A C A T T G C C A A G A T G A C A T G A C A A T G A G A T A A G A T T
646      H K I E T L Y R H C Q D E H D N E I K I
2221    A A A T A C T T C T G T G G C T T T G T G A T C T T A T C T T T A A T G T G G A A G A A G C A T T C T G A T C A T
666      K Y F C G L C D L I F W V E E A F L S H
2281    F A T G A G A G A C C A C A G A T A G A T A T G T A T T G T G T C A G A A A A A C T G A A A C T T C A A T T
686      Y E E H H S I D Y V F V S E K T E T S I
2341    A A A C C G A A G A T G A T T T C C A G T A A T A G A G A C A G T A A C C A G T T A A C T T G T G T G C C G T
706      K T E D D F P V I E T S N Q L T C G C R
2401    G A G A G T A C A C T G T A A A G T C A A C A G A A A A G A G A T T A T A C A G A T G T C C A A A T C A T G
726      E S Y I C K V N R K E D Y S R C L Q I M
2461    C T G G A T A A G A A A C T G T G T T C G T C A G T T T A T G T T C G G C A C A G C A G A C A T T A
746      L D K G K L W F R C S L C S A T A Q N L
2521    A C G A C A T G A A C A C T C A T A T C A T C A A G T G C A A A A A A A G A G A T G A T G A G A G A G A G A G
766      T D M N T H I H Q V H K E K S D E E E Q
30      C A G T A T G T A A T C A A G T G T G G C A C C T G C A C C A A A G C A T T C A T G A T C C T G A G A T G C A C A G
786      Q Y V I K C G T C T K A F H D P E S A Q
2641    C A G C A T T T C C A T A G A A A C A T T G C T T C T A C A G A A C C A G T G T G G C T C A T T T T G A T C T
806      Q H F H R K H C F L Q K P S V A H F G S
2701    G A A A A A T C A A A C T G T A C A A G T T T A C T G T A G T G C T C A C A T A C A G A A A A C T G A A
826      E K S N L Y K F T A S A S H T E R K L K
35      C A G G C A A T A A A C T A T T C A A A A G T T A G A C A T G A G A A G A G A T T G A G A A T G A C T A A G C
2761    Q A I N Y S K S L D M E K G V E N D L S
846      T A T C A G A T A T...
866      Y Q N I...
40 splice variant: 144 base-pairs insertion (accession number AB011148)
      ..A G A G A A G A A A T T G T G A G C T T C C A G A T T T G G A T T A C T G C G A A C C A T G A C T C A T A T A G T
      ..E E E I V E L P D L D Y L R T M T H I V
      C T T T G A G A T T T G A A A C T G T C A A A C T T T T T G T C A T C T A C C A G S C A T C T A A A C C A
      F V D F D N W S N F F G H L P G H L N Q
45      A G G A A C A T T A T T T G G G C T T T C A...
      G T F I W G F Q...
2832      ...A G G A G A A A C A C A A T T G G A G C C T C G S C T C A A C T G T A G A T T T A T A A C
870      ...G G N T N W K F P L N C K I Y N
2881      T A C C T G A C A G A T T G G A T G C T T C C T T C A T C C T C G C T G A T T A A A G A A A G A T G C T
886      Y L N R I G C F F L H P R C S K R K D A
2941      G C T G A T T T T G C C A T A T G A T G C A T G C T G C C O S T C T A G A T G A A C A A C T A C C A G C A A T T
906      A D F A I C N H A G R L D E Q L P K Q I
3001      C C T T T C A C C A T C C T C T C A G G A T C A A G T T T T C T G G A G T A G A A A T C A T T T A A G A A G
926      P F T I L S G D Q G F L E L E N Q F K K
3061      A C T C A G A G G C C A G C T C A T A T A C T A A C C C T C A C C A C T T A G A G G A G A T A T G T G T G C C
946      T Q R P A H I L N P H H L E S D M M C A
3121      T T G T T A A T A G C A T A T C G A T A C C A A A G A T G T G C A C T G A T G A T A C A T G G G T G C C
966      L L N S I S D T T K E C D S D D N N G A
3181      A A A A A T A C T T C A A T A G G A A G A A T T A T A T C C A C A G A S A T G T G G A A T T A G A A G A G C T
986      K N T S I G E E F I S T E D V E L E E A
3241      A T T A G A A G A G T C T T G A G A A A T G T A A T T A A G A T A T T A C C A C A A C A T C A A G T G G C C T
1006      I R R S L E E M

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

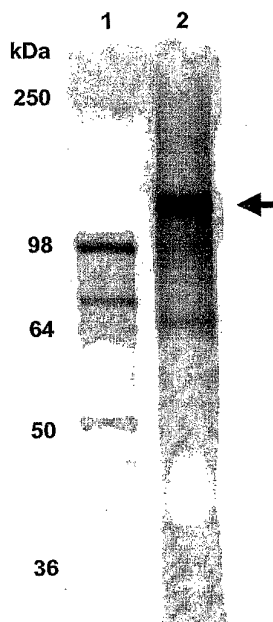
Figure 1 continued

3301 TGAAGAGACTGAGATAACGAATCTTGAGTTTGTCTTCTAAGGAGACAGAAATCCACT
 3361 ATTACAAATCTATTTGAAACATGTTTTCCTTTCATATGTTCAAAATTTGATCTTTGTT
 5 3421 TTGTATTTTGTGCTAATGTCACACATGTACAGAGAAATAGAATACATGTTTCATGCAA
 3481 ATATAAATTAATGATCTAATATAGGTGTACAGTTTCCAGTTAACTTTGAATTTATAT
 3541 ATTTAGATTTAAGGATTAAAAAAGGAAAGCTTTGACAGTTGTTCCCAATAGCAT
 3601 TAGTTCTTTAATTTTATTGTACTGTACAAATGATGCTAGTTTATTTTTCAGCAGTGA
 3661 AATGAATATAAAGGAGTGCATAGGTCAAGTTTCCATAAATCTACTTCTCATGTGGC
 10 3721 ACTATTATATATACCTTTGAGATCTTTGTTTATGTTTATAGAGAGGTTATGGAAC
 3781 TGAATCATGGAACATTTAAATTTTATCAGCAATGTTCTTTGGGCTGCCATGCTATGT
 3841 AATATATTGCTTTAATTAGAGCAGCAATGCTAATAAAGAAATACACTTAATTTTA
 3901 AGAATAATTTAATGAACCAATTTCCATTCTTTTACCTGCTTAGACTTTTATGTGACT
 3961 TGTATGCTCTCCGTGTTAAGGGAATGGTGTGAGATATTGCTAATAAATTTATTTTCAT
 15 4021 AACAGTCCCTTTTATATATTTGGTGTAAACATATATCTTCAGAAATATGTTGAAG
 4081 CCTACTCAGGAATATCTTCTTAAGTCTTTAATTTTATTTTATGTAAGTGTTTTCA
 4141 GTTAGTTATTCAGTGAATGTGAGTTTCCCTTCAATTTGGTATTTACATATTAAATCTTAA
 4201 ATATTGAGGCCCCATTGTGAGTAATAAATAACGACATAGTAGAGACTAAGAGGOC
 4261 TTCTCATATTATCTTTGTATATGCTTCATGTTATTTAACCAGAAATGCTTAATCTTA
 20 4321 AAAATTTTATAGTAAATTTTACCAGACTTAAACATTTCTATAATATAAGCTTT
 4381 TCTTATATTTAAGACAAATATAAGGCTAGAATTTGGTCTCTCTGTAACACTAAA
 4441 TATTTAGTGTGAATTTGAATTTTATTTTATAGTATGCTTTTCAATCTATAATTTGTG
 4501 TTTTAATTTCTGATATGCTCACTTCTGTTCTCCCTGCTTGCAATTTTAAACACTAGAC
 4561 ATTGTGGCTTGAGAAATTTATCATCATCTTCCGAAATGACCAATTTGTGCTTTAGTTT
 25 4621 GTATGTTTAAAGTGGTCAAGCAGGCTCTAGGAGGTAGTCACTGAGCTGACCTTAAACAC
 4681 ATCTGAGGAGCTCACAAAATGGAGCTAAGAGCAATCCAGAAAGAGAGTATGTTAG
 4741 CAGTGTGGGGCAGGCAAGGAGACAGCACCCTTGTGGCAGAGATTCTACACAAAGG
 4801 TGTGATGGACACTGATGCTCTATTAGAGAGCTTTTGTGGTGTGTGAGTGAAGATAAT
 4861 AAGGCTTCTGATAGACAGGAAGGATATTTTCATCATGCTGTTAGAAAGGTAATG
 30 4921 GGTGTTTAAATGTTTAAATGATATTTGTCATGATGCTATTCTACTGTTAATAAT
 4981 AAAATCATCTTAAATTC

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

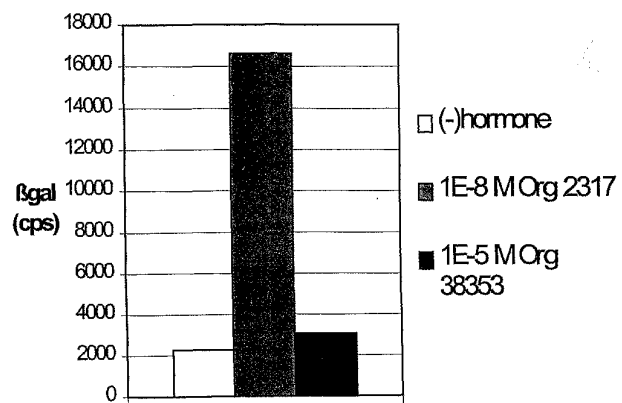
Figure 2



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 3

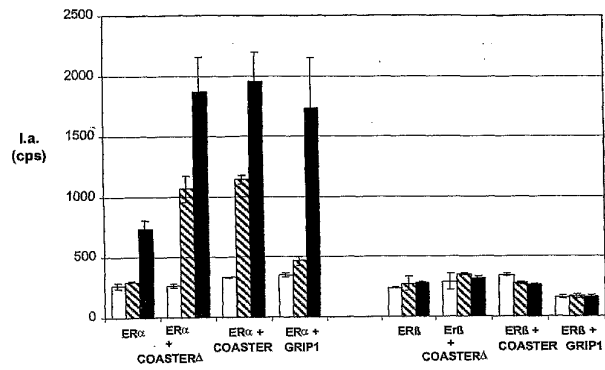


WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 4

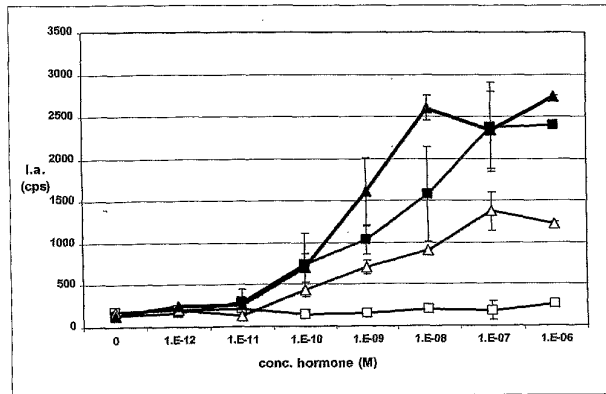
5



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 5

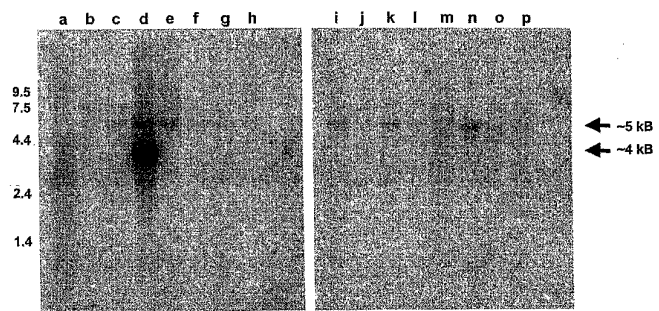


5

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

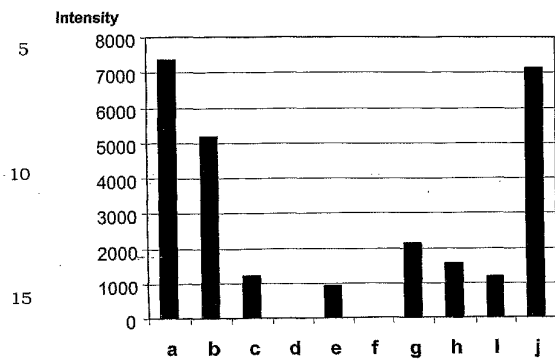
Figure 6



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 7

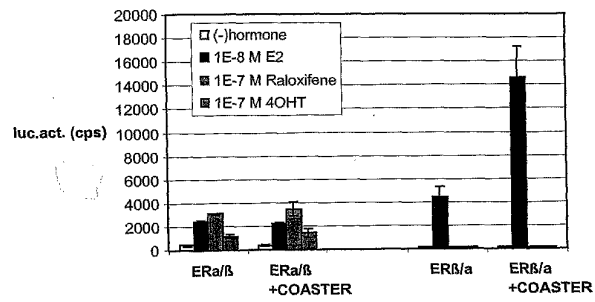


20

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

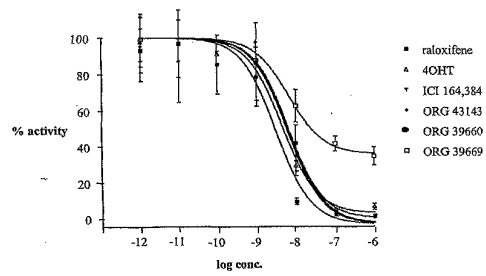
Figure 8



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

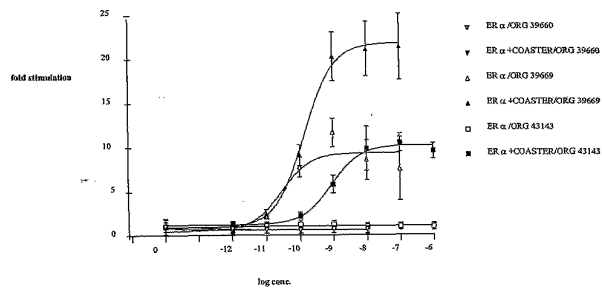
Figure 9



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

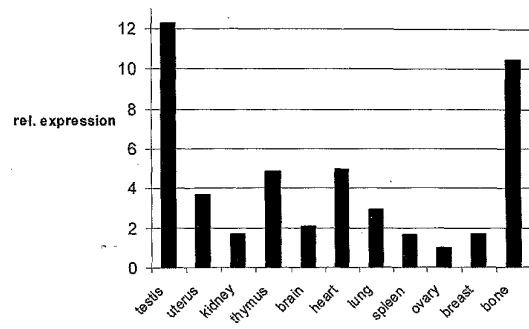
Figure 10



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Figure 11



WO 02/16426

PCT/EP01/09499

SEQUENCE LISTING

<110> Akzo Nobel N.V.

<120> COACTIVATION OF NUCLEAR RECEPTORS

<130> 2000,569WO

<140>

<141>

<150> EP202905.6

<151> 2000-08-21

<150> EP1201771.1

<151> 2001-05-14

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4999

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
ggaagcccg gagtgagaga aagcgggtcc gggggcatag cggggccagta agggccgctc 60
ctcctttgaa gaggttttgc gtctctttcc gccggtggcg tcggcgctca cgcagggggc 120
gggtcccgta gcgcagggcg gtgcagggcg ggaaggggat tcgtggcgac ggcgccggca 180
agggacagca ggagcagtggt tgcgtgcagc gcggcgctcg gagacatggg agaccggggg 240
tcggagataa tagaatctgt cctccagct gccctgagg catctgagtc aacaacggat 300
gaaaatgaag acgacattca gtttgtcagt gaaggaccat tacgacctgt tcttgaatac 360
attgatctgg tcagcagtgat tgatgaagag cctagcaccot cttatactga tgagaatatt 420
aaacgtaaag accatattga ttatcagaag gataaagttg ctttaactct ggctcgtcta 480
gcgcgcgatg ttgaagtga gaaacagcag aagaagaga agaatagagc attcagagaa 540
aaaattgatt ttcagcatgc tcatgggtta caagaattgg aatttattcg aggcattctc 600
gatacagaag cagcaagact gtgtgtggac cagtggctaa aaatgccagg actcaaaaca 660
ggcaaatga attgtggaac aaaaagttca ttccgaagag gagggccacac gtgggtgtct 720
gggaaccaa ttttatgtcc tataatgcac tgtaacaagg agtttgacaa tgggcacctt 780
ctcttaggac atttgaag gttcgcacac totccatgtg atccaacaat tacactacat 840
ggacctttct tcagctcctt tgcttgtgta gtatgttata aaaaatttgt tactcaaca 900
caatatagag atcacctttt tgataaggaa gccacagatg atggacataa caacaacctt 960
cttctcaga ttattcagtg ttttgcatgt ccaaatgtgt tccttctttt tagcagaag 1020
gaggagtgtt caaagcatat gtctggaaag aatcatttcc atcagagttt caaactgggt 1080
gataacaaag gaattgcaca tccaatatct ttcccatott ttgcaaaag acttttgatc 1140
tctctgtgca aagatgttcc ctttcaagtt aagtgtgtgg cctgccaca gacactgcgt 1200
tcccacatgg agctcactgc ccatttcaga gttcattgtc gaaatgctgg acctgtagct 1260
```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

gtagctgaga agagcattac ccagggttga gagaaattca tattaagagg ttattgtcca 1320
 gattgcaatc aagtctttgt ggatgaaacc agcaccocaa atcataagca gaattcagga 1380
 cacaagaatcc gagtcattaa ctocagtggaa gaatcagctc tactctattg ccacagcagc 1440
 gaaggggaaca aggatccctc ttctgacttg catttattgt tggatcaatc aaaattttca 1500
 tcccttaaaa gaacctatgc tattaagaaa tctagctcac tggagtgcac tgcatttcca 1560
 aaaaagaaga tgaatttaaa agataaaaag catgaaggtg ttgcttgtgt ccagaaaagaa 1620
 aaatcagtag ttaaaaacctg gttctgtgaa tgcaatcagc gattcccaag tgaagatgca 1680
 gtgaaaaagc atgtttttctc agcaaacaca atgggttata aatgtgtgtt ctgtggaaaag 1740
 gtatgtgatg attcaggggt cattcgttta cacatgagcc ggattcaccg aggggcacat 1800
 ttaataact ttctttttctg gtgtoggaca tgcaaaaagc agttaacaag gaaagatact 1860
 atcatggcac atgtgactga atttcataat ggacacagat atttttatga gatggatgag 1920
 gtagaaggtg aaactttgcc atcatcctct acaacattgg ataatttgac tgctaacaag 1980
 ccttcacag ctattactgt tattgatcat tccccggcaa atagttctcc gaggggtaaa 2040
 tggcaatgcc ggatttgtga agatagtgtt gattccagc aatatgtaaa acagcaactgc 2100
 atgtcttttg caagccacaa gtttcataga tacagctgtg ctactgcag aaagcctttt 2160
 cataagatag aaacattgta ccgacattgc caagatgagc atgacaatga gataaagatt 2220
 aaatacttct gtgggctttg tgatcttctc tttaagtgg aagaagcatt tctgagtcac 2280
 tatgaggagc accacagcat agattatgta ttgtgtcag aaaaaactga aacttcaatt 2340
 aaaaacgaag atgattttcc agtaaatagc accagtaacc agttaacttg tgggtgcctg 2400
 gagagttaca tctgtaaaat caacagaaaa gaagattata gcagatgtct ccaaatcatg 2460
 ctggataaag gaaaactgtg gtttcgctgc agtttatgtt cggcaacagc acagaattta 2520
 accgacatga acactcatat ccatcaagtg cacaagaaa agagtgtaga ggaggagcag 2580
 cagtatgtaa tcaagtgttg cactgcacc aaagcatttc atgactctga gagtgcacag 2640
 cagcatttcc atagaaaaa ttgcttctta cagaaaccca gtgtggctca ttttggatct 2700
 gaaaaatcaa acctgtacaa gtttactgct agtgctcacc atacagagag aaaaactgaa 2760
 caggcaataa actattcaaa aagtttagac atggagaaag gatttgagaa tgacctaaag 2820
 tatcagaata taggaggaaa cccaattgg aagcctcogo tcaactgtaa gatttataac 2880
 tacctgaaca ggattggatg cttcttctct catcctcgct gtagtaaaag aaaagatgct 2940
 gctgattttg ccatatgtat gcatgctggc cgtctagatg aacaactacc caagcaaat 3000
 cctttcacca tctctcagg agatcaaggt tttctggagc tagagaatca atttaagaag 3060
 actcagagcg cagctcatat actaaacct caccacttag agggagatat gatgtgtgcc 3120
 ttgttaataa gcatatctga taccaccaa gaatgtgaca gtgatgataa catgggtgcc 3180
 aaaaactact caataggaga agaatttata tccacagaag atgtggaatt agaagaagct 3240
 attagaagaa gtcttgagga aatgtaatta aagatattac cacacaacat caagtggcct 3300
 tgaagagact gagataacga attcttgagt ttgttttcta aaggagacca gaaatccact 3360
 attacaaatg tatttgaaaa catgtttttg ctttcatatg ttcaaaattt gatctttgtt 3420
 ttgtattttt gtgctaattg gcaaacatgt acagaagaaa tagaatacat gttcatgcaa 3480
 atataaatta tgtattctaa tatagggtga acagtttccc agttaacttt gaatttata 3540
 atttagattt aaaggattaa aaaaaggaa agctcttgac agttgtttcc caaatagcat 3600
 tagttcttta attttatttg tactgtacaa atgatgctag ttatttttt tagcagtga 3660
 aatgaatata aaaaagggtg catagggtcaa gttttccata aattctactt ctcatgtggc 3720
 actattatata aatacctttg agatctttgt ttatgtttat tagaagaggg taatggaaac 3780
 tgatcatgga aacattttaa attttatcag caatgttctt tgtgggtgcc atgcataatg 3840
 aaattatttg tttaattaga gcagcacatt gctaaaataa aaaatacacc ttaattttta 3900
 agaataaatt taaatgaaac aatttccatt cttttacct gottagactt ttatgtgact 3960
 tgatgggtct cctgggttaa ggaatgggt tcagaatatt tgcataaaat tatttttcat 4020
 aacgtctctt ttttatatat tgggtgaaac ataataattc tcaagaata atgttgaaa 4080
 cctactcagg aataatcttc cttaactctt taaattttta ttcatgtga agtgttttca 4140

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

gttttagttat tcaactgaatt gtcagtttcc ttoatttggg attacatatt taattcttaa 4200
atatgtaggc cccattgtga gtaataaaaa atacgacata agtagaagac taagaagggc 4260
ttgtcatatt atcttttgtt atatgcttca tgttatttaa ccagaaatgt cttatctcta 4320
aaaaatttta gtagtaatta tttaaccaac ttaaaaaacat ttctataaat ataaagcttt 4380
tctttatatt taagacaaaa tataaaggct agaatttggg tccttctctg taacaactaa 4440
tatttttagt tgaattgaa tttttttatt actatagtct tttoaatcta taatttgggt 4500
ttttaatttc ttgatatgtc acttctgttc ctccctgctt gcatttttta aaaactagac 4560
atigtggctt gagaatttat caatcatctt tccgaatga ccacattgtg cttttagttt 4620
gtatgtttta gtggtcaagc aaggctctag gaggtagtca ctgagctgga cottaacac 4680
atctgcagga gctcacaaaa tgggagcaaa agaggcatto cagaagaag agtagttaag 4740
cagatgtggg ggcagggcaa gaggagacag caccctgttg ccagagattc tacacaaagg 4800
tgtgtggac actgatgctc tattaagaag cttttgtggg gtgtgtggta gagaataatt 4860
aaggcttctg ataagacagg aaagggatat ttcacatga ctgttaagaa aaggttaactg 4920
ggtgttttaa tgttttaatt gataattgtc actgatcgta ttctacttg ttaataaatt 4980
aaaaatcatc ttaaaattc 4999

```

<210> 2

<211> 4999

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

ggaagcccg gagtgcagaa aagcggctcc gggggcatag cggggcagta agggccgctc 60
ctcctttgaa gaggttttgc gtctctttcc gccggtggcg tggcgctca cgcaggggcg 120
gggtcccgga ggcagggcg gtgcagggcg ggaaggggat tctgtggcga ggcggcgcca 180
agggacagca ggcagcagtg tctgtccagc gcggccgtcg gagacatggg agaccggggg 240
tcggagataa tagaatctgt cctccagctt ggcctgagg catctgagtc aacaacggat 300
gaaaatgaag acgacatcoa gtttgtcagt gaaggacctt tacgacctgt tottgaatac 360
attgatctgg tcagcagtgta tgatgaagag cctagcacct cttatactga tgagaataat 420
aaacytaaaag accatattga ttatcagaag gataaagttg ctttaactct ggctcgtcta 480
gcccgccatg ttgaagtgga gaaacagcag aaagaagaga agaataagagc attcagagaa 540
aaaattgatt ttcagcatgc tcatgggtta caagaattgg aatttattcg aggacattct 600
gatacagaag cagcaagact gtgtgtggac cagtggctaa aaatgccagg actcaaaaca 660
ggcacaatta attgtggaac aaaaagttca ttccgaagag gaggcacac gtgggtgtct 720
gggaaaccaa ctttatgtcc tataatgcac tgtaacaagg agtttgacaa tgggcacctt 780
ctcttaggac atttgaanaa gttcgatcac tctccatgtg atccacaat tacactacat 840
ggacctttct tcagtccttt tgcttgtgta gtatgttata aaaaatttgt tactcaacaa 900
caatatagag atcacctttt tgataaggaa gccacagatg atggacataa caacaacctt 960
cttctcaga ttattcagtg ttttgcatgt ccaaatgtct tcttctttt tagcagaaag 1020
gaggagtgtt caaagcatat gtctggaaag aatcatttcc atcagagttt caaactgggt 1080
gatacaaaag gaattgcaca tccaatatct ttcccatctt ttgcacaaag acttttgatc 1140
tctctgtgca aagatgttcc ctttcaagtt aagtgtgtgg cctgccacaa gacactgcgt 1200
toccacatgg agctcactgc ccatttcaga gttcattgtc gaaatgctgg acctgtagct 1260
gtagctgaga agagcattac ccaggttgca gagaattca tattaagagg ttattgtcca 1320
gattgcaatc aagtctttgt ggatgaaacc agcaccocaa atcataagca gaattcagga 1380
cacaaagtcc gagtcattaa ctcaaggtaa gaatcagctt tactctattg ccacagcagc 1440
gaagggaaca aggatcttcc ttctgacttg catttattgt tggatcaatc aaaattttca 1500

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

tcaacttaaaa gaaccatgtc tattaagaag tctagctcac tggagtgcac tgcattcca 1560
aaaaagaaga tgaatttaaa agataaaagc catgaaggtg ttgcttgtgt ccagaaagaa 1620
aaatcagtag ttaaaacctg gttctgtgaa tgcaatcagc gattcccaag tgaagatgca 1680
gtagaaaagc atgtttttct agcaaacaca atgggttata aatgtgtggt ctgtggaaag 1740
gtatgtgatg attcaggggt cattcgttta cacatgagcc ggattcacgg aggggcacat 1800
ttaataactt ttcttttctg gtgtcggaca tgcaaaaagg agttaacaag gaaagatact 1860
atcatggcac atgtgactga atttcataat ggacacagat atttttatga gatggatgag 1920
gtagaagggt aacctttgac atcatcctct acaacattgg ataatttgac tgctaacaag 1980
ccttcacagc ctattactgt tattgatcat tcccgccgaa atagtctcc gaggggtaaa 2040
tggcaatgcc ggatttgtga agatatgttt gattcccgag aatatgtaaa acagcaactgc 2100
atgtctttgg caagccacaa gtttcataga tacagctgtg ctactctgag aaagcctttt 2160
cataagatag aaacatttga ccgacattgc caagatgagc atgacaatga gataaagatt 2220
aaatacttct gtgggctttg tgatcttctc tttaatgtgg aagaagcatt tctgagtcac 2280
tatgaggagc accacagcat agattatgta ttgtgtcag aaaaaactga aacttcaatt 2340
aaaaacgaag atgattttcc agtaatagag accagtaacc agttaacttg tggttgcctg 2400
gagagttaaa tctgtaaagt caacagaaaa gaagattata gcagatgtct ccaaatcatg 2460
ctggataaag gaaaaactgt gtttcgctgc agtttatgtt cggcaacago acagaattta 2520
accgacatga acactcatat coactcaagt cacaagaaga agagtgtatg ggaggagcag 2580
cagtatgtaa tcagagtgtg cactctgacc aaagcatttc atgatcctga gagtgcacag 2640
cagcattttcc atagaaaaa ttgcttctta cagaaaccca gtgtggctca ttttggatct 2700
gaaaaatcaa acctgtacaa gtttactgct agtgcctcac atacagagag aaaaactgaa 2760
caggcaataa actattcaaa aagtttagac atggagaaag gaggtagaga tgacctaaag 2820
tatcagaata taggaggaaa caccaattgg aagcctccgc tcaactgtaa gatttataac 2880
taacctgaac ggattggatg cttcttctct catcctcctg gtatgaaaaa aaaagatgct 2940
gctgattttg ccatatgtat gcatgctggc cgtctagatg aacaactacc caagcaaat 3000
cctttcacca tctctcagg agatcaaggt tttctggagc tagagaatca atttaagaag 3060
actcagagcc cagctcatat actaaacct caccacttag agggagatat gatgtgtgcc 3120
ttgttaataa gcatatctga taccaccaa gaatgtgaca gtgatgataa catgggtgcc 3180
aaaaatactt caataggaga agaatttata tccacagaag atgtggaatt agaagaagct 3240
attagaagaa gtcttgagga aatgtaatta aagatattac cacacaacat caagtggcct 3300
tgaagagact gagataacga attcttgagt ttgttttcta aaggagacca gaaatccact 3360
attacaatgt tatttgaaaa catgtttttg ctttcataatg ttcaaaattt gatctttgtt 3420
ttgtattttt gtgctaagt gcaaacatgt acagaagaaa tagaatacat gttcatgcaa 3480
atataaatta tgtattctaa tatagggtga acagtttccc agttaacttt gaatttata 3540
atttagattt aaaggattaa aaaaaaggaa agctcttgac agttgtttcc caaatagcat 3600
tagttcttta atttttattg tactgtacaa atgatgctag ttatttttt tagcagtga 3660
aatgaatata aaaaagggtg cataggtcaa gttttccata aattctactt ctcatgtggc 3720
actattatat aataaccttg agatctttgt ttatgtttat tagaagaggg taatggaaac 3780
tgatcatgga aacattttaa attttatcat caatgttctt tgtgggtgcc atgcatatgt 3840
aaaattattg ttaattaga gcagcaccat gctaaaataa aaaatacacc ttaattttta 3900
agaaataatt taaatgaac aatttccatt cttttacctt gcttagactt ttatgtgact 3960
tgtatggtct cctgggtaaa gggaaatggg tcagaatatt tgcataaaat tatttttcat 4020
aacagtcctt ttttatatat tgggtgaac ataattctt tcaagaata atgtgaaag 4080
cctactcagg aataactctt ctttaactct taaattttta ttcatgtga agtgttttca 4140
gtttagtatt tcaactgaatt gtcagtttcc ttcatgttgt attacatatt taattcttaa 4200
atatgagggc cccattgtga gtaataaaaa atacgacata agtagaagac taagaagggc 4260
ttgtcatatt atctttgtgt atatgcttca tgttatttaa ccagaaatgt cttatctcta 4320
aaaaatttta gtagttaatta ttaccacac ttaaaaacat ttctataaat ataaagcttt 4380

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

tctttatatt taagacaaaa tataaaggct agaatttgggt tcttctcttg taacactaaa 4440
tatttttagtg tgaattgaa tttttttatt actatagtct ttccaatcta taatttgggt 4500
ttttaatttc ttgatattgc acttctgttc ctccctgctt goatttttta aaaactagac 4560
attgtggctt gagaatttat caatcatctt tccgaatatg ccacattgtg cttttagttt 4620
gtatgtttaa gtggtcaagc aaggtctctag gaggtagtca ctgagctgga ccttaaacac 4680
atctgcagga gctcācaaaa tgggagcaaa agaggcattc cagaaagaag agtagttaag 4740
cagatgtggg ggcagggcaa gaggagacag cacottgttg ccagagattc tacacaaagg 4800
tgtgatggac actgatgtct tattaagaag cttttgtgtg gtgtgtggtg gagaataatt 4860
aaggtctctg ataagacagg aaaggatat ttcatcatga ctgttaagaa aaggttaactg 4920
ggtgttttaa tgttttaatt gataattgtc actgatcgta ttctacttg ttaataaatt 4980
aaaaatcatc ttaaaattc 4999

```

<210> 3

<211> 5144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

ggaagcccgaggagtgagaga aagcgggtcc gggggcatag cgggccagta agggccgctc 60
ctcccttgaa gaggttttgc gtctctttcc gccggtggcg tcggcgctca cgcaggggcg 120
gggtcccggtg gcgccaggcg gtgcaggggc ggaaggggat tctgtggcgc gccggcgcca 180
agggacagca ggaagcagtg tgctgtcagc gcggccgtcg gagacatggg agaccggggg 240
tcggagataa tagaatctgt cctccagct gccctgagg catctgagtc aacaacggat 300
gaaaaatgaag acgacattca gtgtgtcagt gaaggacat tacgacctgt tcttgaatac 360
attgatctgg tcagcagtga tgatgaagag cctagcactt ctataactga tgagaatatt 420
aaacgtaaag accatattga ttatcagaag gataaagttg ctttaactct ggctcgtcta 480
gcccgccatg ttgaagtga gaaacagcag aaagaagaga agaataagac attcagagaa 540
aaaattgatt ttcagcatgc tcatgggtta caagaattgg aatttattcg aggcatttct 600
gatacagaag cagcaagact gtgtgtggac cagtggctaa aaatgccagg actcaaaaca 660
ggcacaatta attgtggaac aaaaagttca ttccgaagag gagggccacac gtgggtgtct 720
gggaaaccaa ttttatgtcc tataatgcac tgtaacaagg agtttgacaa tgggcacott 780
ctcttaggac atttgaaaag gttcgatcac tctccatgtg atccaacaat tacaactacat 840
ggacotttct tcagotcctt tgcttggta gtatgttata aaaaatttgt tactcaacaa 900
caatatagag atcacctttt tgataaggaa gccacagatg atggacataa caacaacctt 960
cttctcaga ttattcagtg ttttgcatgt ccaaatgtct tcttctttt tagcagaag 1020
gaggagtgtt caaagcatat gtctggaaag aatcatttcc atcagagttt caaactgggt 1080
gataacaaag gaattgcaca tccaatatct ttccatctt ttgcaaaaga acttttgatc 1140
tctctgtgca aagatgttcc ctttcaagtt aagtggtgtg cctgccacaa gacactgcgt 1200
tcccacatgg agctcactgc ccatttcaga gttcattgtc gaaatgctgg acctgtagct 1260
gtagctgaga agagcattac ccagggttga gagaaattca tattaagagg ttattgtcca 1320
gattgcaatc aagtccttgt ggaatgaacc agcacccaaa atcataagca gaattcagga 1380
cacaaagtcc gagtcattaa ctcatgggaa gaatcagttt tactctattg ccacagcagc 1440
gaagggaaca aggatccttc ttctgacttg catttattgt tggatcaatc aaaatttca 1500
tacttaaaaa gaacctgtc tattaagaa tctagctcac tggagtgcac tgccattcca 1560
aaaaagaaga tgaattttaa agataaaagc catgaagggt tgcttgtgt ccagaaagaa 1620
aatcagtag ttaaaacctg gttctgtgaa tgcaatcagc gattcccaag tgaagatgca 1680
gtagaaaaag atgttttctc agcaaacaca atgggttata aatgtgtgt ctgtggaaag 1740

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

gtatgtgatg attcaggggt cattcgttta cacatgagcc ggattcaccg aggggcacat 1800
ttaataaact ttcttttctg gtgtcggaca tgcaaaaagg agttaaccaag gaaagatact 1860
atcatggcac atgtgactga atttcaataa ggacacagat atttttatga gatggatgag 1920
gtagaagggt aaacttttgc atcatctctc acaacattgg ataatttgac tgctaacaag 1980
ccttcatcag ctattactgt tattgatcat tcccggcaa atagtctcc gaggggtaaa 2040
tggaatgcc ggatttgtga agatatgttt gattcccagg aatatgtaaa acagcaactgc 2100
atgtctttgg caagccacaa gtttcataga tacagctgtg ctcaactgcag aaagcctttt 2160
cataagatag aaacatttga ccgacattgc caagatgagc atgacaatga gataaagatt 2220
aaatacttct gtgggctttg tgatcttato tttaattgtg aagaagcatt tctgagtcac 2280
tatgaggagc accacagcat agattatgta ttgtgtcag aaaaaactga aacttcaatt 2340
aaaaccgaag atgattttcc agtaatagag accagtaacc agttaacttg tggttgccgt 2400
gagagttaca tctgtaaaat caacagaaaa gaagattata gcagatgtct ccaaatcatg 2460
ctggataaag gaaaactgtg gtttcgctgc agtttatgtt cggcaacagc acagaattta 2520
accgacatga acactcatat ccatcaagtg cacaagaaa agagtgtga ggaggagcag 2580
cagtattgtaa tcaagtgttg cactgcaccc aaagcatttc atgatcctga gagtgcacag 2640
cagattttcc atagaaaaa ttgcttctta cagaaaccca gtgtggctca ttttggatct 2700
gaaaaatcaa acotgtacaa gtttactgot agtgctcacc atacagagag aaaactgaaa 2760
caggcaataa actattcaaa aagtttagac atggagaaag gagttgagaa tgacctaaag 2820
tatcagaata tagaggaaga aattgttgag ctccagatt tggattacct gogaaccatg 2880
actcatatag tctttgtaga ttttgataac tgggtcaaac tttttgttca tctaccagg 2940
catctaaacc aaggaaacatt tatttggggc ttccaaagga ggaacacca attggaagcc 3000
tcogctcaac tgtaagattt ataactacct gaacaggatt ggtgcttct tcttctacc 3060
tcgctgtagt aaaagaaaag atgctgctga ttttgccata tgtatgcatg ctggccgtct 3120
agatgaacaa ctaccacagg aaattccttt caccatctct tcaggagatc aaggttttct 3180
ggagctagag aatcaattta agaagaactca gaggccagct catatactaa accctacca 3240
cttagaggga gatatgatgt gtgcottgtt aaatagcata tctgtacca ccaagaatg 3300
tgacagtgat gataacatgg gtgcacaaaa tacttcaata ggagaagaat ttatatccac 3360
agaagatgtg gaattagaag aagctattag aagaagtctt gaggaatgt aattaaagat 3420
attaccacac aacatcaagt ggccttgaag agactgagat aacgaattct tgagtttgtt 3480
ttctaaagga gaccagaaat ccaactattac aaatgtattt gaaaacatgt tttgtcttcc 3540
atatgttcaa aatttgcctt ttgttttgta tttttgtgct aatgtgcaaa catgtacaga 3600
agaaatagaa tacatgttca tgcaaatata aattatgtat tctaatatag gtgtaacagt 3660
ttccagttta actttgaatt tatatattta gatttaaagg attaaaaaaa aggaaagctc 3720
ttgacagttg ttcccaaat agcattagtt cttaattttt atttgtactg tacaatgat 3780
gctagtttat ttttttagca gtgaaaatga atataaaaaa ggtgacatag gtcaagtttt 3840
ccataaattc tacttctcat gtggcaactat tatataatac ctttgagatc tttgtttatg 3900
tttattagaa gagggtaatg gaaactgac atggaaacat ttaaaatttt atcagcaatg 3960
ttctttgtgg gtgccatgca tatgtaaatt attgttttaa ttagagcagc acattgctaa 4020
aataaaaaat acaccttaat ttttaagaaa taattttaat gaaacaattt ccattccttt 4080
tacctgctta gacttttatg tgacttgtat ggtctcctgg ttaaagggaa tgggtgtcaga 4140
atatttgcac aaaattattt ttcataacag tcccttttta tatattgggt taaacataat 4200
attcttcaag aaataatgtt gaaagcctac tcagggaataa tcttccttaa ctctttaa 4260
ttttatttca tgtgaagtgt ttccagttta gttattcact gaattgtcag ttctctcat 4320
ttggtattac atatttattt cttaaatatt gaggcccat tgtgagtaat aaaaaatag 4380
acataagtag aagactaaga agggcttgtc atattatctt tgtgtatatg ctcatgtta 4440
tttaaccaga aatgtcttat ctctaaaaat ttttagtagt aattatttac caaacttaa 4500
aacatttcta taaatataaa gcttttcttt atatttaaga caaatataa aggctagaat 4560
ttggtctctt ctctgtaaca ctaaaatttt tagtgtgaaa ttgaattttt ttattactat 4620

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

agtccttttca atctataatt tgtgttttta atttcttgat atgtcaactc tgttctctcc 4680
tgcttgccatt ttttaaaac tagacattgt ggcttgagaa tttatcaatc atctttccga 4740
aatgaccaca ttgtgctttt agtttgtatg ttaagtgggt caagcaaggc tctaggaggt 4800
agtcactgag ctggacctta aacacatctg caggagctca caaatggga gcaaaagagg 4860
cattccagaa agaagagtag ttaagcagat gtggggggcag gcaagagga gacagcact 4920
tgttgccaga gattctacac aaaggtgtga tggacactga tgctctatta agaagctttt 4980
gtggtgtgtg tggtagagaa taattaaggc ttctgataag acaggaaagg gatatttcat 5040
catgactgtt aagaaaaggt aactgggttg tttaatgtt taattgataa ttgtcactga 5100
tcgtatttct acttgttaaa taattaaaaa tcatcttaaa attc 5144

```

<210> 4

<211> 5144

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

ggaagccggg gaggtagaga aagcggctcc gggggcatag cgggccagta agggccgctc 60
ctcctttgaa gaggttttgc gtctctttcc gcgggtggcg tcggcgctca cgcaggggcg 120
ggtcocggta gcgcaggcg gtgcaggcg ggaaggggat tcgtggcgac ggcgcgga 180
agggacagca ggaagcagtg tgctgtcagc gcggcgctcg gagacatggg agacccgggg 240
tcggagataa tagaatctgt ccctccagct ggcctgagg catctgagtc aacaacggat 300
gaaaatgaag acgacattca gtttgtcagt gaaggacatc tacgacctgt tcttgaaatc 360
atgatctgg tcagcagta tgatgaagag cctagcaact cttatactga tgagaatatt 420
aaacgtaaag accatattga ttatcagaag gataaagttg ctttaactct ggctcgtcta 480
gcccgcacat ttgaagtga gaaacagcag aaagaagaga agaataagag attcagagaa 540
aaaattgatt ttcagcagtc tcatgggtta caagaattgg aattttattc aggcatttct 600
gatacagaag cagcaagact gtgtgtggac cagtggctaa aaatgccagg actcaaaaca 660
ggcacaatta atttgtgaac aaaaagtcca ttcogaagag gaggccacac gtgggtgtct 720
gggaaccaca ctttatgtcc tataatgcac tgtaaccaag agtttgacaa tgggcacctt 780
ctcttaggac atttgaaga gttcagatcac tctccatgtg atccaacaat tacactacat 840
ggacctttct tcagctcctt tgcttgtgta gtatgttata aaaaatttgt taotcaacaa 900
caatatagag atcacctttt tgataaggaa gccacagatg atggacataa caacaacctt 960
cttcctcaga ttattcagtg ttttgcatgt ccaaatgtct tcttctttt tagcagaaag 1020
gaggaggttt caaagcata gtctggaaag aatcatttcc atcagagttt caaactgggt 1080
gataacaaag gaattgcaca tccaatctct tcccatctt ttgcaagaa aottttgatc 1140
tctctgtgca aagatgttcc ctttcaagtt aagtggtggt cctgccaca gacactgcgt 1200
tcccacatgg agctcactgc ccatttcaga gttcattgtc gaaatgctgg acctgtagct 1260
gtagctgaga agagcattac ccagggttga gaaaaattca tattaagagg ttattgtoca 1320
gattgcaatc aagtccttgt ggaatgaacc agcaccocaa atcataagca gaattcagga 1380
cacaaagtcc gagtcattaa ctacgtggaa gaatcagctc tactctattg ccacagcagc 1440
gaagggaaca aggatccttc ttctgacttg cattattgt tggatcaatc aaaattttca 1500
tcaattaaaa gaacatgttc tattaagaa tctagctcac tggagtgcac tgccattcca 1560
aaaaagaaga tgaatttaaa agataaaagc catgaaggtg ttgcttgtgt ccagaagaa 1620
aaatcagtag ttaaaacctg gttctgtgaa tgcaatcagc gattcccaag tgaagatgca 1680
gtagaaaaagc atgttttctc agcaaacaca atgggttata aatgtgtggt ctgtggaaag 1740
gtatgtgatg attcaggggt cattcgttta cacatgagcc ggattcacgg aggggcacat 1800
ttaataact ttcttttctg gtgtcggaca tgcaaaagg agttaacaag gaaagatact 1860

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

atcatggcac atgtgactga atttcataat ggacacagat atttttatga gatggatgag 1920
 gtagaagggtg aaactttgcc atcatcctct acaacattgg ataatttgac tgctaacaag 1980
 ccttcatcag ctattactgt tattgatcat tccccggcaa atagttctcc gaggggtaaa 2040
 tggcaatgcc ggattttgtga agatatgttt gattcccagg aatatgtaaa acagcactgc 2100
 atgtcttttg caagccacaa gtttcataga tacagctgtg ctcaactgcag aaagcctttt 2160
 cataagatag aaacattgta ccgacattgc caagatgagc atgacaatga gataaagatt 2220
 aaatacttct gtgggctttg tgatcttatc tttaattggtg aagaagcatt tctgagtcac 2280
 tatgaggagc accacagcat agattatgta tttgtgtcag aaaaaactga aacttcaatt 2340
 aaaacccaag atgattttcc agtaatagag accagtaaco agttaacttg tgggtgcctg 2400
 gagagttaca tctgtaaagt caacagaaaa gaagattata gcagatgtct ccaaatcatg 2460
 ctggataaag gaaaactgtg gtttcgtcgc agtttatgtt cggcaacagc acagaattta 2520
 accgacatga acactcatat coactcaagt cacaagaaa agagtgatga ggaggacagc 2580
 cagtatgtaa tcaagtgtgg caccctgcaco aaagcatttc atgatcctga gagtgcacag 2640
 cagcatttcc atagaaaaa ttccttctta cagaaaccca gtgtggctca ttttggatct 2700
 gaaaaatcaa accgtacaaa gtttactgct agtgcctcac atacagagag aaaaactgaaa 2760
 caggcaataa actattcaaa aagtttagac atggagaaa gagttgagaa tgacctaaagc 2820
 tatcagaata tagaggaaga aattgtttgag cttccagatt tggattacot ggcgaacctg 2880
 actcatatag totttgtaga ttttgataac tggtaaaact ttttggtoa tctaccaggg 2940
 catctaaacc aaggaaactt tatttggggc tttcaaggga ggaacaccca attggaagcc 3000
 tccgtcaaac tgtaagattt ataactacot gaacaggatt ggatgctct tcttcatcc 3060
 togtctagt aaaagaaaag atgctgtcga ttttgcata tgtatgcagc ctggcctctc 3120
 agatgaacaa ctacccaagc aaattccttt caccatcctc tcaggagato aaggttttct 3180
 ggagctagag aatcaattta agaagactca gaggccagct catatactaa accctcaca 3240
 cttagaggga gatatgatgt gtgccttggt aaatagcata tctgatacca ccaagaagt 3300
 tgacagtgat gataacatgg gtgcaaaaa tacttcaata ggagaagaat ttatatccac 3360
 agaagatgtg gaattagaag aagctattag aagaagtctt gaggaatgt aattaaagat 3420
 attaccacac aacatcaagt ggccttgaag agactgagat aacgaattct tgagtttgtt 3480
 ttctaaaggga gaccagaaat ccactattac aaatgtattt gaaaacatgt ttttgcttcc 3540
 atatgttcaa aatttgatct ttgttttgtt tttttgtgct aatgtgcata catgtacaga 3600
 agaaaatagaa tacatgttca tgcaaatata aattatgtat tctaataatg gtgtaacagt 3660
 ttcccagtta actttgaatt tatatattta gatttaaagg attaaaaaaa aggaaagctc 3720
 ttgacagttg ttcccaaat agcattagtt cttaattttt atttgtactg tacaatgat 3780
 gctagtttat ttttttagca gtgaaaatga atataaaaaa ggtgacatag gtcaagtttt 3840
 ccataaatcc tactttcat gtggcactat tatataaac ctltgagatc tttgtttatg 3900
 tttattagaa gagggtaatg gaaactgato atggaaacat ttaaaatttt atcagcaatg 3960
 tttcttgtgg gtgcactgca tatgtaaatt attgctttaa ttagagcagc aacttgcata 4020
 aataaaaaat acaccttaat ttttaagaaa taattttaa gaaacaattt ccattccttt 4080
 tactctgctta gacttttatg tgacttgtat ggtctcctgg ttaaggga tggtgtcaga 4140
 atatttgcat aaaaattatt ttcataacag tcttttttta tatattgttg taaacataat 4200
 attcttcaag aaataatgtt gaaagcctac tcaggaaata tcttctttaa ctctttaaat 4260
 ttttatttca tgtgaagtgt ttccagtta gttatccact gaattgtcag tttcctcat 4320
 ttggtattac atatttaatt cttaaatatt gagggcccat tgtgagtaat aaaaaatagc 4380
 acataagtag aagactaaga agggcttgto atattatctt tgtgtatatg ctcatgtta 4440
 ttttaaccaga aatgtcttat ctctaaaaat ttttagtagt aattatttac caaacttaaa 4500
 aacatttcta taaatataaa gcttttcttt atatttaaga caaaatataa aggctagaat 4560
 ttggttctct ctctgtacaa cttaaatatt tagtgtgaaa ttgaattttt ttattactat 4620
 agtcttttca atctataatt tgtgttttta atttcttgat atgtcacttc tgttctccc 4680
 tggctgcatt ttttaaaaa tagacattgt ggccttgaaa tttatcaatc atctttccga 4740

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

aatgaccaca ttgtgctttt agtttgtatg ttttaagtgt caagcaaggc tctaggaggt 4800
agtoactgag ctggacctta aacacatctg caggagctca caaaatggga gcaaaagagg 4860
cattccagaa agaagagtag ttaagcagat gtgggggcag gccaagagga gacagcacct 4920
tgttgccaga gattctacac aaaggtgtga tggacactga tgctctatta agaagctttt 4980
gtggtgtgtg tggtagagaa taattaaagc ttctgataag acaggaaaagg gatatttcat 5040
catgactgtt aagaaaaggt aactgggttg tttaatgttt taattgataa ttgtcactga 5100
tcgtatttct acttgtaaaa taattaaaaa tcactctaaa attc 5144

```

<210> 5

<211> 3042

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

atgggagacc cggggtcgga gataatagaa tctgtccctc cagctggccc tgaggcatct 60
gagtcacaaa cggatgaaaa tgaagacgac attcagtttg tcagtgaagg accattacga 120
cctgttcttg aatacattga tctgttcagc agtgatgatg aagagcctag cactctctat 180
actgatgaga atattaaacg taaagaccat attgattatc agaaggataa agttgcttta 240
actctggctc gtctagcccg ccatgttgaa gtggagaaac agcagaaaga agagaagaat 300
agagcattca gagaaaaaat tgattttcag catgctcatg ggttacaaga attggaattt 360
attcgaggac attctgatac agaagcagca agactgtgtg tggaccagtg gctaaaaatg 420
ccaggactca aaacaggcac aattaattgt ggaacaaaaa gtccattccg aagaggaggc 480
cacactggg gtcttgggaa accaatttta tgtcctataa tgcactgtaa caaggagttt 540
gacaatgggc acctctctct aggcatttg aaaaggttcg atcactctcc atgtgatcca 600
acaattacac tacatggacc ttctctcagc tctttgtctt gtgtagtatg ttataaaaaa 660
tttgttactc aacaacaata tagagatcac ctitttgata aggaagccac agatgatgga 720
cataacaaca accttcttcc tcagattatt cagtgttttg catgtccaaa ttgcttccct 780
ctttttagca gaaaggagga gtgttcaaa catatgtctg gaaagaatca ttcccatcag 840
agtttcaaac tgggtgataa caaaggaatt gcacatccaa tatctttccc atcttttgca 900
aagaaacctt tgatctctct gtgcaaagat gtcccttttc aagttaagtg tgtggcctgc 960
cacaagacac tgcgttccca catggagctc actgcccatt tcagagttca ttgtcgaaat 1020
gctggacctg tagctgtagc tgagaagagc attaccagg ttgcagagaa attcatatta 1080
agaggittat gtccagattg caatcaagtc tttgtggatg aaaccagcac ccaaatcat 1140
aagcgaattt caggacacaa agtccgagtc attaactcag tggaaagaatc agtcttactc 1200
tattgccaca gcagcgaagg gaacaaggat ccttctctct acttgcatct attgttgatg 1260
caatcaaaat ttcatcact taaaagaacc atgtctatta aagaatctag ctactggag 1320
tgcatggcca ttccaaaaaa gaagatgaat ttaaaagata aaagccatga aggtgttgtc 1380
tgtgtccaga aagaaaaatc agtagttaaa acctgggtct gtgaatgcaa tcagcgatcc 1440
ccaagtgaag atgcagtaga aaagcatgtt ttctcagcaa acacaatggg ttataaatgt 1500
gtggtctgtg gaaaggtatg tgatgattca ggggtcattc gtttacacat gagccggatt 1560
cacggagggg cacatttaaa taactttctt ttctgtgtgc ggacatgcaa aaaggagtta 1620
acaaggaaag atactatcat ggcacatgtg actgaatttc ataattggca cagatatttt 1680
tatgagatgg atgaagtaga aggtgaaact ttgccatcat cctctacaac attggataat 1740
ttgactgcta acaagccttc atcagctatt actgttattg atcattcccc ggcaaatagt 1800
tctccgaggg gtaaatggca atgccggatt tgtgaagata tgtttgatcc ccaggaaat 1860
gtaaaacagc actgcagtgc ttgggcaagc cacaagtttc atagatacag ctgtgctcac 1920
tcagaaaagc cttttcataa gatagaacaa ttgtaccgac attgccaaaga tgagcatgac 1980

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

aatgagataa agattaaata cttctgtggg ctttgtgato ttatctttaa tgggaagaa 2040
gcatttctga gtcattatga ggagcaccac agcatagatt atgtatttgt gtcagaaaaa 2100
actgaaacct caattaaaaa cgaagatgat ttccagtaa tagagaccag taaccagtta 2160
acttgtggtt gccgtgagag ttacatctgt aaagtcacaa gaaaagaaga ttatagcaga 2220
tgtctccaaa tcatgtctga taaaggaaaa ctgtggttcc gctgcagttt atgttcggca 2280
acagcacaga atttaaccga catgaacact catatccatc aagtgcacaa agaaaagagt 2340
gatgaggagg agcagcagta tgtaatcaag tgtggcacct gcaccaaaag atttcatgat 2400
cctgagagtg cacagcagca ttccataga aaacattgct tcttacagaa acccagtggt 2460
gtctatcttg gatctgaaaa atcaaacctg tacaagttaa ctgotagtgc ctcaatata 2520
gagagaaaaa tgaacagggc aataaactat tcaaaaagtt tagacatgga gaaaggagt 2580
gagaatgacc taagctatca gaatatagga gaaaacacca attggaagcc tccgctcaac 2640
tgtaagattt taactacct gaacaggatt ggatgcttct tccttcatcc tcgctgtagt 2700
aaaagaaaaa atgtctgtga ttttgccata tgtatgcgat ctggcogtct agatgaacaa 2760
ctaccaagc aaattccttt caccatctct tcaggagato aaggttttct ggagctagag 2820
aatcaattta agaagactca gagccagct catatactaa accctcacca cttagagggg 2880
gatatgatgt gtgcctgttt aaatagcata totgatacca ccaagaagat tgacagtgat 2940
gataacatgg gtgccaaaaa tacttcaata ggagaagaat ttatatccac agaagatgtg 3000
gaattagaag aagctattag aagaagtctt gaggaatgt aa 3042

```

<210> 6

<211> 3042

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

atggggagacc cggggtcgga gataatagaa tctgtccctc cagctggccc tgggcatct 60
gagtcacaaa cggatgaaaa tgaagacgac attcagtttg tcagtgaagg accattacga 120
cctgttcttg aatacattga tctggtcagc agtgatgatg aagagcctag caccctctat 180
actgatgaga atattaaacg taaagaccat attgattatc agaaggataa agttgcttta 240
actctgggtc gtctagcccg ccatgttgaa gtggagaaac agcagaaga agagaagaat 300
agagcatcca gaaaaaaat tgattttcag catgctcatg gggtacaaga attggaattt 360
attcgaggac attctgatac agaagcagca agactgtgtg tggaccagt gctaaaaatg 420
ccaggactca aaacaggcac aattaattgt ggaacaaaaa gtccattccg aagaggaggc 480
cacacgtggg tgtctgggaa accaacttta tgtctataa tgcactgtaa caaggagt 540
gacaatgggc accctctctt aggcatttg aaaaaggttc atcactctcc atgtgatcca 600
acaattacac tacatggacc tttcttcagc tcotttgcct gtgtagtatg ttataaaaaa 660
tttgttaact aacaacaata tagagatcac ctttttgata aggaagccac agatgatgga 720
cataacaaca accctctctc tcagattatt cagtgttttg catgtccaaa ttgcttctct 780
ctttttagca gaaaggagga gtgttcaaag catatgtctg gaaagaatca tttccatcag 840
agtttcaaac tgggtgataa caaaggaatt gcacatccaa tatctttccc atcttttgca 900
aagaaacttt tgatctctct gtgcaaagat gttcccttcc aagttaagtg tgtggcctgc 960
cacaagacac tgcgttccca catggagctc actgccattt tcagagttca ttgtcgaaat 1020
gtctggacctg tagctgtagc tgagaagagc attaccaggt ttgcagagaa attcatatta 1080
agagggtatt gtccagattg caatcaagtc tttgtggatg aaaccagcac ccaaatcat 1140
aagcagaatt caggacacaa agtcogagtc attaactcag tggaagaatc agtcttactc 1200
tattgccaac gcagcgaagg gaacaaggat cttcttctg acttgcat 1260
caatcaaat tttcatcact taaaagaacc atgtctatta aagaatctag ctcactggag 1320

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

tgcattgccca ttccaaaaaa gaagatgaat ttaaaagata aaagccatga aggtgttgct 1380
tgtgtccaga aagaaaaaatc agtagttaaa acctggttct gtgaatgcaa tcagcgattc 1440
ccaagtgaag atgcagtaga aaagcatgtt ttctcagcaa acacaatggg ttataaatgt 1500
gtggctctgtg gaaaggtatg tgatgatcca ggggtcattc gtttacacat gagccggatt 1560
cacggaggggg cacatttaaa taactttctt ttctggtgtc ggacatgcaa aaaggagtta 1620
acaaggaaag atactatcat ggcacatgtg actgaatttc ataattggaca cagatatitt 1680
tatgagatgg atgaggtaga aggtgaaact ttgccatcat cctctacaac attggataat 1740
ttgactgcta acaagccttc atcagctatt actgttattg atcattcccc ggcaaatagt 1800
tctccgagggg taaatggca atgcccgtat tgtgaagata tgtttgatto ccaggaatat 1860
gtaaaacagc actgcattgc ttggcaagc cacaagtttc atagatacag ctgtgtctcac 1920
tgcagaaagc cttttcataa gatagaaca ttgtaccgac attgccaaga tgagcatgac 1980
aatgagataa agattaaata cttctgtggg ctttgtgato ttatctttaa tgggaaagaa 2040
gcattttcga gtcattatga ggagcaccac agcatagatt atgtatttgt gtcagaaaaa 2100
actgaaactt caattaaaac ogaagatgat ttccagtaa tagagaccag taaccagtta 2160
acttgtggtt gccgtgagag ttacatctgt aaagtcaaca gaaaagaaga ttatagcaga 2220
tgttccaaa toatgctgga taaaggaaaa ctgtggttcc gctgcagttt atgttcggca 2280
acagcacaga atttaaccga catgaacact catatccato aagtgcaaaa agaaaagagt 2340
gatgaggagg agcagcagta tgtaatcaag tgtggccact gcaccaaaagc atttcatgat 2400
cctgagagtg caagcagca ttccataga aaacatttgt tcttacagaa acccagtggt 2460
gctcattttg gatctgaaaa atcaaacctg tacaagttta ctgctagtgc ctacacata 2520
gagagaaaaa tgaacacaggc aataaactat tcaaaaagtt tagacatgga gaaaggagtt 2580
gagaatgacc taagctatca gaatatagga ggaacacca attggaagcc tccgctcaac 2640
tgtaagattt ataactacct gaacaggatt ggaatgctct tcctcatcc tcgctgtagt 2700
aaaagaaaag atgctgtgta ttttgccata tgtatgcatg ctggccgtctc agatgaacaa 2760
ctaccaagc aaattccttt caccatcttc tcaggagatc aagggtttct ggagctagag 2820
aatcaattta agaagactca gaggccagct catatactaa accctcacca cttagaggga 2880
gatatgatgt gtgccttggt aatagcata ctgatacca ccaaagaatg tgacagtgat 2940
gataacatgg gtgccccaaa tacttcaata ggagaagaat ttatatccac agaagatgtg 3000
gaattagaag aagctattag aagaagtctt gaggaatgt aa 3042

```

<210> 7
 <211> 1013
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Met Gly Asp Pro Gly Ser Glu Ile Ile Glu Ser Val Pro Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ser Glu Ser Thr Thr Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ile Gln
 20 25 30
 Phe Val Ser Glu Gly Pro Leu Arg Pro Val Leu Glu Tyr Ile Asp Leu
 35 40 45
 Val Ser Ser Asp Asp Glu Glu Pro Ser Thr Ser Tyr Thr Asp Glu Asn
 50 55 60

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

Ile Lys Arg Lys Asp His Ile Asp Tyr Gln Lys Asp Lys Val Ala Leu
65          70          75          80

Thr Leu Ala Arg Leu Ala Arg His Val Glu Val Glu Lys Gln Gln Lys
85          90          95

Glu Glu Lys Asn Arg Ala Phe Arg Glu Lys Ile Asp Phe Gln His Ala
100         105         110

His Gly Leu Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Gly His Ser Asp Thr Glu
115         120         125

Ala Ala Arg Leu Cys Val Asp Gln Trp Leu Lys Met Pro Gly Leu Lys
130         135         140

Thr Gly Thr Ile Asn Cys Gly Thr Lys Ser Ser Phe Arg Arg Gly Gly
145         150         155         160

His Thr Trp Val Ser Gly Lys Pro Ile Leu Cys Pro Ile Met His Cys
165         170         175

Asn Lys Glu Phe Asp Asn Gly His Leu Leu Leu Gly His Leu Lys Arg
180         185         190

Phe Asp His Ser Pro Cys Asp Pro Thr Ile Thr Leu His Gly Pro Phe
195         200         205

Phe Ser Ser Phe Ala Cys Val Val Cys Tyr Lys Lys Phe Val Thr Gln
210         215         220

Gln Gln Tyr Arg Asp His Leu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Asp Asp Gly
225         230         235         240

His Asn Asn Asn Leu Leu Pro Gln Ile Ile Gln Cys Phe Ala Cys Pro
245         250         255

Asn Cys Phe Leu Leu Phe Ser Arg Lys Glu Glu Cys Ser Lys His Met
260         265         270

Ser Gly Lys Asn His Phe His Gln Ser Phe Lys Leu Gly Asp Asn Lys
275         280         285

Gly Ile Ala His Pro Ile Ser Phe Pro Ser Phe Ala Lys Lys Leu Leu
290         295         300

Ile Ser Leu Cys Lys Asp Val Pro Phe Gln Val Lys Cys Val Ala Cys
305         310         315         320

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

His Lys Thr Leu Arg Ser His Met Glu Leu Thr Ala His Phe Arg Val
 325 330 335
 His Cys Arg Asn Ala Gly Pro Val Ala Val Ala Glu Lys Ser Ile Thr
 340 345 350
 Gln Val Ala Glu Lys Phe Ile Leu Arg Gly Tyr Cys Pro Asp Cys Asn
 355 360 365
 Gln Val Phe Val Asp Glu Thr Ser Thr Gln Asn His Lys Gln Asn Ser
 370 375 380
 Gly His Lys Val Arg Val Ile Asn Ser Val Glu Glu Ser Val Leu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Cys His Ser Ser Glu Gly Asn Lys Asp Pro Ser Ser Asp Leu His
 405 410 415
 Leu Leu Leu Asp Gln Ser Lys Phe Ser Ser Leu Lys Arg Thr Met Ser
 420 425 430
 Ile Lys Glu Ser Ser Ser Leu Glu Cys Ile Ala Ile Pro Lys Lys Lys
 435 440 445
 Met Asn Leu Lys Asp Lys Ser His Glu Gly Val Ala Cys Val Gln Lys
 450 455 460
 Glu Lys Ser Val Val Lys Thr Trp Phe Cys Glu Cys Asn Gln Arg Phe
 465 470 475 480
 Pro Ser Glu Asp Ala Val Glu Lys His Val Phe Ser Ala Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Tyr Lys Cys Val Val Cys Gly Lys Val Cys Asp Asp Ser Gly Val
 500 505 510
 Ile Arg Leu His Met Ser Arg Ile His Gly Gly Ala His Leu Asn Asn
 515 520 525
 Phe Leu Phe Trp Cys Arg Thr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Lys Asp
 530 535 540
 Thr Ile Met Ala His Val Thr Glu Phe His Asn Gly His Arg Tyr Phe
 545 550 555 560
 Tyr Glu Met Asp Glu Val Glu Gly Glu Thr Leu Pro Ser Ser Ser Thr
 565 570 575

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala Asn Lys Pro Ser Ser Ala Ile Thr Val
 580 585 590
 Ile Asp His Ser Pro Ala Asn Ser Ser Pro Arg Gly Lys Trp Gln Cys
 595 600 605
 Arg Ile Cys Glu Asp Met Phe Asp Ser Gln Glu Tyr Val Lys Gln His
 610 615 620
 Cys Met Ser Leu Ala Ser His Lys Phe His Arg Tyr Ser Cys Ala His
 625 630 635 640
 Cys Arg Lys Pro Phe His Lys Ile Glu Thr Leu Tyr Arg His Cys Gln
 645 650 655
 Asp Glu His Asp Asn Glu Ile Lys Ile Lys Tyr Phe Cys Gly Leu Cys
 660 665 670
 Asp Leu Ile Phe Asn Val Glu Glu Ala Phe Leu Ser His Tyr Glu Glu
 675 680 685
 His His Ser Ile Asp Tyr Val Phe Val Ser Glu Lys Thr Glu Thr Ser
 690 695 700
 Ile Lys Thr Glu Asp Asp Phe Pro Val Ile Glu Thr Ser Asn Gln Leu
 705 710 715 720
 Thr Cys Gly Cys Arg Glu Ser Tyr Ile Cys Lys Val Asn Arg Lys Glu
 725 730 735
 Asp Tyr Ser Arg Cys Leu Gln Ile Met Leu Asp Lys Gly Lys Leu Trp
 740 745 750
 Phe Arg Cys Ser Leu Cys Ser Ala Thr Ala Gln Asn Leu Thr Asp Met
 755 760 765
 Asn Thr His Ile His Gln Val His Lys Glu Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 770 775 780
 Gln Gln Tyr Val Ile Lys Cys Gly Thr Cys Thr Lys Ala Phe His Asp
 785 790 795 800
 Pro Glu Ser Ala Gln Gln His Phe His Arg Lys His Cys Phe Leu Gln
 805 810 815
 Lys Pro Ser Val Ala His Phe Gly Ser Glu Lys Ser Asn Leu Tyr Lys
 820 825 830

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Phe Thr Ala Ser Ala Ser His Thr Glu Arg Lys Leu Lys Gln Ala Ile
 835 840 845
 Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Met Glu Lys Gly Val Glu Asn Asp Leu
 850 855 860
 Ser Tyr Gln Asn Ile Gly Gly Asn Thr Asn Trp Lys Pro Pro Leu Asn
 865 870 875 880
 Cys Lys Ile Tyr Asn Tyr Leu Asn Arg Ile Gly Cys Phe Phe Leu His
 885 890 895
 Pro Arg Cys Ser Lys Arg Lys Asp Ala Ala Asp Phe Ala Ile Cys Met
 900 905 910
 His Ala Gly Arg Leu Asp Glu Gln Leu Pro Lys Gln Ile Pro Phe Thr
 915 920 925
 Ile Leu Ser Gly Asp Gln Gly Phe Leu Glu Leu Glu Asn Gln Phe Lys
 930 935 940
 Lys Thr Gln Arg Pro Ala His Ile Leu Asn Pro His His Leu Glu Gly
 945 950 955 960
 Asp Met Met Cys Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ser Asp Thr Thr Lys Glu
 965 970 975
 Cys Asp Ser Asp Asp Asn Met Gly Ala Lys Asn Thr Ser Ile Gly Glu
 980 985 990
 Glu Phe Ile Ser Thr Glu Asp Val Glu Leu Glu Glu Ala Ile Arg Arg
 995 1000 1005
 Ser Leu Glu Glu Met
 1010

 <210> 8
 <211> 1013
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 Met Gly Asp Pro Gly Ser Glu Ile Ile Glu Ser Val Pro Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ser Glu Ser Thr Thr Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ile Gln

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

20 25 30
 Phe Val Ser Glu Gly Pro Leu Arg Pro Val Leu Glu Tyr Ile Asp Leu
 35 40 45
 Val Ser Ser Asp Asp Glu Glu Pro Ser Thr Ser Tyr Thr Asp Glu Asn
 50 55 60
 Ile Lys Arg Lys Asp His Ile Asp Tyr Gln Lys Asp Lys Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Leu Ala Arg Leu Ala Arg His Val Glu Val Glu Lys Gln Gln Lys
 85 90 95
 Glu Glu Lys Asn Arg Ala Phe Arg Glu Lys Ile Asp Phe Gln His Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Gly His Ser Asp Thr Glu
 115 120 125
 Ala Ala Arg Leu Cys Val Asp Gln Trp Leu Lys Met Pro Gly Leu Lys
 130 135 140
 Thr Gly Thr Ile Asn Cys Gly Thr Lys Ser Ser Phe Arg Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 His Thr Trp Val Ser Gly Lys Pro Thr Leu Cys Pro Ile Met His Cys
 165 170 175
 Asn Lys Glu Phe Asp Asn Gly His Leu Leu Leu Gly His Leu Lys Arg
 180 185 190
 Phe Asp His Ser Pro Cys Asp Pro Thr Ile Thr Leu His Gly Pro Phe
 195 200 205
 Phe Ser Ser Phe Ala Cys Val Val Cys Tyr Lys Lys Phe Val Thr Gln
 210 215 220
 Gln Gln Tyr Arg Asp His Leu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Asp Asp Gly
 225 230 235 240
 His Asn Asn Asn Leu Leu Pro Gln Ile Ile Gln Cys Phe Ala Cys Pro
 245 250 255
 Asn Cys Phe Leu Leu Phe Ser Arg Lys Glu Glu Cys Ser Lys His Met
 260 265 270
 Ser Gly Lys Asn His Phe His Gln Ser Phe Lys Leu Gly Asp Asn Lys

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

275 280 285
 Gly Ile Ala His Pro Ile Ser Phe Pro Ser Phe Ala Lys Lys Leu Leu
 290 295 300
 Ile Ser Leu Cys Lys Asp Val Pro Phe Gln Val Lys Cys Val Ala Cys
 305 310 315 320
 His Lys Thr Leu Arg Ser His Met Glu Leu Thr Ala His Phe Arg Val
 325 330 335
 His Cys Arg Asn Ala Gly Pro Val Ala Val Ala Glu Lys Ser Ile Thr
 340 345 350
 Gln Val Ala Glu Lys Phe Ile Leu Arg Gly Tyr Cys Pro Asp Cys Asn
 355 360 365
 Gln Val Phe Val Asp Glu Thr Ser Thr Gln Asn His Lys Gln Asn Ser
 370 375 380
 Gly His Lys Val Arg Val Ile Asn Ser Val Glu Glu Ser Val Leu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Cys His Ser Ser Glu Gly Asn Lys Asp Pro Ser Ser Asp Leu His
 405 410 415
 Leu Leu Leu Asp Gln Ser Lys Phe Ser Ser Leu Lys Arg Thr Met Ser
 420 425 430
 Ile Lys Glu Ser Ser Ser Leu Glu Cys Ile Ala Ile Pro Lys Lys Lys
 435 440 445
 Met Asn Leu Lys Asp Lys Ser His Glu Gly Val Ala Cys Val Gln Lys
 450 455 460
 Glu Lys Ser Val Val Lys Thr Trp Phe Cys Glu Cys Asn Gln Arg Phe
 465 470 475 480
 Pro Ser Glu Asp Ala Val Glu Lys His Val Phe Ser Ala Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Tyr Lys Cys Val Val Cys Gly Lys Val Cys Asp Asp Ser Gly Val
 500 505 510
 Ile Arg Leu His Met Ser Arg Ile His Gly Gly Ala His Leu Asn Asn
 515 520 525
 Phe Leu Phe Trp Cys Arg Thr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Lys Asp

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

530 535 540
 Thr Ile Met Ala His Val Thr Glu Phe His Asn Gly His Arg Tyr Phe
 545 550 555 560
 Tyr Glu Met Asp Glu Val Glu Gly Glu Thr Leu Pro Ser Ser Ser Thr
 565 570 575
 Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala Asn Lys Pro Ser Ser Ala Ile Thr Val
 580 585 590
 Ile Asp His Ser Pro Ala Asn Ser Ser Pro Arg Gly Lys Trp Gln Cys
 595 600 605
 Arg Ile Cys Glu Asp Met Phe Asp Ser Gln Glu Tyr Val Lys Gln His
 610 615 620
 Cys Met Ser Leu Ala Ser His Lys Phe His Arg Tyr Ser Cys Ala His
 625 630 635 640
 Cys Arg Lys Pro Phe His Lys Ile Glu Thr Leu Tyr Arg His Cys Gln
 645 650 655
 Asp Glu His Asp Asn Glu Ile Lys Ile Lys Tyr Phe Cys Gly Leu Cys
 660 665 670
 Asp Leu Ile Phe Asn Val Glu Glu Ala Phe Leu Ser His Tyr Glu Glu
 675 680 685
 His His Ser Ile Asp Tyr Val Phe Val Ser Glu Lys Thr Glu Thr Ser
 690 695 700
 Ile Lys Thr Glu Asp Asp Phe Pro Val Ile Glu Thr Ser Asn Gln Leu
 705 710 715 720
 Thr Cys Gly Cys Arg Glu Ser Tyr Ile Cys Lys Val Asn Arg Lys Glu
 725 730 735
 Asp Tyr Ser Arg Cys Leu Gln Ile Met Leu Asp Lys Gly Lys Leu Trp
 740 745 750
 Phe Arg Cys Ser Leu Cys Ser Ala Thr Ala Gln Asn Leu Thr Asp Met
 755 760 765
 Asn Thr His Ile His Gln Val His Lys Glu Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 770 775 780
 Gln Gln Tyr Val Ile Lys Cys Gly Thr Cys Thr Lys Ala Phe His Asp

WO 02/16426 PCT/EP01/09499

785 790 795 800

Pro Glu Ser Ala Gln Gln His Phe His Arg Lys His Cys Phe Leu Gln
805 810 815

Lys Pro Ser Val Ala His Phe Gly Ser Glu Lys Ser Asn Leu Tyr Lys
820 825 830

Phe Thr Ala Ser Ala Ser His Thr Glu Arg Lys Leu Lys Gln Ala Ile
835 840 845

Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Met Glu Lys Gly Val Glu Asn Asp Leu
850 855 860

Ser Tyr Gln Asn Ile Gly Gly Asn Thr Asn Trp Lys Pro Pro Leu Asn
865 870 875 880

Cys Lys Ile Tyr Asn Tyr Leu Asn Arg Ile Gly Cys Phe Phe Leu His
885 890 895

Pro Arg Cys Ser Lys Arg Lys Asp Ala Ala Asp Phe Ala Ile Cys Met
900 905 910

His Ala Gly Arg Leu Asp Glu Gln Leu Pro Lys Gln Ile Pro Phe Thr
915 920 925

Ile Leu Ser Gly Asp Gln Gly Phe Leu Glu Leu Glu Asn Gln Phe Lys
930 935 940

Lys Thr Gln Arg Pro Ala His Ile Leu Asn Pro His His Leu Glu Gly
945 950 955 960

Asp Met Met Cys Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ser Asp Thr Thr Lys Glu
965 970 975

Cys Asp Ser Asp Asp Asn Met Gly Ala Lys Asn Thr Ser Ile Gly Glu
980 985 990

Glu Phe Ile Ser Thr Glu Asp Val Glu Leu Glu Glu Ala Ile Arg Arg
995 1000 1005

Ser Leu Glu Glu Met
1010

<210> 9
<211> 3183
<212> DNA

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

<213> Homo sapiens

<400> 9

```

atggggagacc cggggtcggg gataatagaa tctgtccctc cagctggccc tgaggcatct 60
gagtcacaaa cggatgaaaa tgaagacgac attcagtttg tcagtgaagg accattacga 120
cctgttcttg aatacattga tctggtcagc agtgatgatg aagagcctag cacctcttat 180
actgatgaga atattaaacg taaagaccat attgattatc agaaggataa agttgcttta 240
actctggctc gtctagcccg ccatgttgaa gtggagaaac agcagaaaaa agagaagaat 300
agagcattca gagaaaaaat tgattttcag catgctcatg ggttacaaga attggaattt 360
attcaggagg attctgatac agaagcagca agactgtgtg tggaccagtg gctaaaaatg 420
ccaggactca aaacaggcac aattaattgt ggaacaaaaa gtctattcog aagaggaggc 480
cacacgtggg tgtctgggaa accaatttta tgtcctataa tgcactgtaa caaggagttt 540
gacaaatggg accttctctt aggcattttg aaaaggttcg atcactctcc atgtgatcca 600
acaattacac tacatggacc ttctctcago tcttttgott gtgtagtatg ttataaaaaa 660
tttgttactc aacaacaata tagagatcac ctttttgata aggaagccac agatgatgga 720
cataacaaca accttcttcc tcagattatt cagtgttttg catgtccaaa ttgotttctt 780
ctttttagca gaaaggagga gtgttcaaaag catatgtctg gaaagaatca ttccatcag 840
agtttcaaac tgggtgataa caaagggaatt gcacatccaa tatctttccc atcttttgca 900
aagaaacttt tgatctctct gtgcaaaagt gtctcccttc aagttaagtg tgtggcctgc 960
cacaagacac tgcgttccca catggaagtc actgccatt tcagagtcca ttgtogaaat 1020
gctggacctg tagctgtagc tgagaagagc attaccaggc ttgcagagaa attcatatta 1080
agaggttatt gtccagattg caatcaagtc tttgtggatg aaaccagcac ccaaaatcat 1140
aagcagaatt caggacacaa agtccgagtc attaacctag tggagaatc agtcttactc 1200
tattgccaca gcagcgagg gaaccaaggat ccttcttctg acttgcatth attgttggat 1260
caatcaaaat ttctatcact taaaagaacc atgtctatta aagaatctag ctcactggag 1320
tgcattgcca ttccaaaaa gaagatgaat ttaaaagata aaagccatga aggtgttgct 1380
tgtgtccaga aagaaaaatc agtagttaaa acctggttct gtgaatgcaa tcagcgattc 1440
ccaagtgaag atgcagtaga aaagcatgtt ttctcagcaa acacaatggg ttataaatgt 1500
gtggtctgtg gaaaggtatg tgatgattca ggggtcattc gtttacacat gagccggatt 1560
cacggagggg cacatttaaa taactttctt ttctggtgtc ggacatgcaa aaaggagtta 1620
acaaggaaag atactatcat ggcacatgtg actgaatttc ataattgaca cagatatttt 1680
tatgagatgg atgaggtaga agtgaaaact ttgccatcat cctctacaac attggataat 1740
ttgactgcta acaagccttc atcagctatt actgttattg atcattcccc ggcaaatagt 1800
tctccgaggg gtaaatggca atgcgggatt tgtgaagata tgtttgattc ccaggaaat 1860
gtaaaacagc actgcatgtc ttggccaagc cacaagtttc atagatacag ctgtgctcac 1920
tgcaagaagc cttttcataa gatagaaca ttgtacggac attgccaaag tgagcatgac 1980
aatgagataa agattaaata cttctgtggg ctttgtgac ttatotttaa tgtggaagaa 2040
gcatttctga gtcattatga ggagcaccac agcatagatt atgtatttgt gtcagaaaaa 2100
aotgaaactt caattaaaac cgaagatgat ttccagtaa tagagaccag taaccagtta 2160
aottgtggtt gcogtgagag ttacatctgt aaagtcacaa gaaaagaaga ttatagcaga 2220
tgtctccaaa tcatgctgga taaaggaaaa ctgtggtttc gctgcagttt atgttcggca 2280
acagcacaga atttaacoga catgaacact catatccatc aagtgccaaa agaaaaagat 2340
gatgaggagg agcagcagta tgtaatcaag tgtggcacct goaccaaagc atttcatgat 2400
cctgagagtg cacagcagca ttccataga aaacattgct tcttacagaa acccagtggt 2460
gctcatcttg gatctgaaaa atcaaacctg tacaagttaa ctgctagtgc ctcaatata 2520
gagagaaaaa tgaacaggc aataaactat tcaaaaagtt tagacatgga gaaaggagtt 2580
gagaatgacc taagctatca gaatatagag gaagaaattg ttgagcttcc agatttggat 2640
tacctgcgaa ccatgactca tatagtcttt gtagattttg ataactggtc aaactttttt 2700

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

gggtcatctac cagggtcatct aaaccaagga acattttatt ggggctttca aggaggaac 2760
accaattgga agcctcgcgt caactgtaag atttataact acctgaacag gattggatgc 2820
ttcttccttc atcctcgcgt tagtaaaaga aaagatgctg ctgattttgc catatgtatg 2880
catgctggcc gtctagatga acaactaccc aagcaaatc ctttcacccat cctctcagga 2940
gatcaaggtt ttctggagct agagaatcaa tttaagaaga ctacagaggcc agctcatata 3000
ctaaaccttc accacttaga gggagatag atgtgtgctt tgttaaatag catatctgat 3060
accaccaaaag aatgtgacag tgatgataac atgggtgcca aaaatacttc aataggagaa 3120
gaattttatc ccacagaaga tgtggaatta gaagaagcta ttagaagaag tcttgaggaa 3180
atg 3183

```

<210> 10
 <211> 3183
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

```

<400> 10
atgggagacc cggggtcgga gataatagaa totgtccctc cagctggccc tgaggcatct 60
gagtcaacaa cggatgaaaa tgaagacgac attcagtttg tcagtgaagg accattacga 120
cctgttcttg aatacattga tctggtcagc agtgatgatg aagagcctag cactctttat 180
actgatgaga atattaaacg taaagaccat attgattatc agaaggataa agttgcttta 240
actctggctc gtctagcccg ccatgttgaa gtggagaaac agcagaaaga agagaagaat 300
agagcattca gagaaaaaat tgattttcag catgctcatg ggttacaaga attggaattt 360
attcaggacc attctgatac agaagcagca agactgtgtg tggaccagtg gctaaaaatg 420
ccaggactca aaacaggcac aattaattgt ggaacaaaaa gtctattccg aagaggagcc 480
cacacgtggg tgtctgggaa accaaattta tgcctataa tgcactgtta caaggagttt 540
gacaatgggc accttctctt aggaacattg aaaagggttg atcactctcc atgtgatcca 600
acaattacac tacatggacc tttcttcagc tcttttgctt gtgtagtatg ttataaaaaa 660
tttgttactc aacaacaata tagagatcac ctttttgata aggaagccac agatgatgga 720
cataacaaca accttctctc tcagattatt cagtgttttg catgtccaaa ttgcttctct 780
ctttttagca gaaaggagga gtgttcaaa catatgtctg gaaagaatca tttccatcag 840
agtttcaaac tgggtgataa caaagggaat gcacatccaa tatctttccc atcttttgca 900
aagaaacttt tgatctctct gtgcaaatgt gttccctttc aagttaagtg tgtggcctgc 960
cacagacac tgctgtccca catggagctc actgcccatt tcagagtcca ttgtcgaaat 1020
gctggacctg tagctgtagc tgagaagagc attaccagg ttgcagagaa attcatatta 1080
agaggttatt gtccagattg caatcaagtc tttgtggatg aaaccagcac ccaaaatcat 1140
aagcagaatt caggacacaa agtccgagtc attaactcag tggagaatc agtcttactc 1200
tattgccaca gcagcgaagg gaacaaggat ccttctctg acttgcatth attgttgatg 1260
caatcaaat tttcatcact taaaagaacc atgtctatta aagaatctag ctactggag 1320
tgcatgcca ttccaaaaaa gaagatgaat ttaaaagata aaagccatga aggtgttgct 1380
tgtgtccaga aagaaaaatc agtagttaa acctggttct gtgaatgcaa tcagcgattc 1440
ccaagtgaag atgcagtaga aaagcatgtt ttctcagcaa acacaatggg ttataaatgt 1500
gtggtctgtg gaaaggtatg tgatgattca ggggtcattc gtttacacat gagccggatt 1560
cacggagggg cacatttaaa taactttctt ttctggtgtc ggacatgcaa aaaggagtta 1620
acaaggaag atactatcat ggcacatgtg actgaatttc ataagggaca cagatatttt 1680
tatgagatgg atgaggtaga aggtgaaact ttgccatcat cctctacaac attggataat 1740
ttgaactgta acaagccttc atcagctatt actgttattg atcattcccc ggcaaatagt 1800
tctccagggg gtaaatggca atgcccgtat tgtgaagata tgtttgattc ccagggaatat 1860

```

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

gtaaaacagc actgcatgtc ttgggcaagc cacaagtttc atagatacag ctgtgctcac 1920
tgcagaaagc cttttcataa gatagaaaca ttgtaccgac attgccaaga tgagcatgac 1980
aatgagataa agattaaata cttctgtggg ctttgtgato ttatotttaa tgtggaagaa 2040
gcattttctga gtcattatga ggagcaccac agcatagatt atgtatttgt gtcagaaaaa 2100
actgaaactt caattaaaac cgaagatgat ttccagtaa tagagaccag taaccagtta 2160
acttgtgtgtt gccgtgagag ttacatctgt aaagtcaaca gaaaagaaga ttatagcaga 2220
tgtctccaaa tcatgctgga taaagaaaaa ctgtggtttc gctgcagttt atgttcggca 2280
acagcacaga atttaaccga catgaacact catatccatc aagtgcacaa agaaaagagt 2340
gatgaggagg agcagcagta tgtaatcaag tgtggcacct gcaccaagc attcatgat 2400
cctgagagtg cagcagcagca ttccataga aaacattgct tcttacagaa acccagtggt 2460
gctcattttg gatctgaaaa atcaaacctg tacaagttaa ctgctagtgc ctcacatata 2520
gagagaaaaa tgaacacaggc aataaactat tcaaaaagtt tagacatgga gaaaggagtt 2580
gagaatgacc taagctatca gaatatagag gaagaaattg ttgagcttcc agatttggat 2640
taoctgogaa ccactgactca tatagtcttt gtagattttg ataactggto aaactttttt 2700
ggctcatctac cagggcatct aaaccaagga acatttattt ggggctttca aggaggaaac 2760
accaattgga agcctccgct caactgtaag atttataact acctgaacag gattggatgc 2820
ttcttcttc atcctcgtgt tagtaaaaga aaagatgctg ctgattttgc catatgtatg 2880
catgctggcc gtctagatga acaactaccc aagcaaatcc cttcacccat cctctcagga 2940
gatcaaggtt ttctggagct agagaatcaa tttagaaga ctcagaggcc agctcatata 3000
ctaaaccttc accacttaga gggagatatg atgtgtgcct tgttaaatag catatctgat 3060
accaccaag aatgtgacag tgatgataac atgggtgcc aataacttc aataggagaa 3120
gaatttatat ccacagaaga tgtggaatta gaagaagcta ttagaagaag tcttgaggaa 3180
atg 3183

```

<210> 11
 <211> 1061
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Met Gly Asp Pro Gly Ser Glu Ile Ile Glu Ser Val Pro Pro Ala Gly
 1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ser Glu Ser Thr Thr Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ile Gln
 20 25 30
 Phe Val Ser Glu Gly Pro Leu Arg Pro Val Leu Glu Tyr Ile Asp Leu
 35 40 45
 Val Ser Ser Asp Asp Glu Glu Pro Ser Thr Ser Tyr Thr Asp Glu Asn
 50 55 60
 Ile Lys Arg Lys Asp His Ile Asp Tyr Gln Lys Asp Lys Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Leu Ala Arg Leu Ala Arg His Val Glu Val Glu Lys Gln Gln Lys
 85 90 95

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Glu Glu Lys Asn Arg Ala Phe Arg Glu Lys Ile Asp Phe Gln His Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Gly His Ser Asp Thr Glu
 115 120 125
 Ala Ala Arg Leu Cys Val Asp Gln Trp Leu Lys Met Pro Gly Leu Lys
 130 135 140
 Thr Gly Thr Ile Asn Cys Gly Thr Lys Ser Ser Phe Arg Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 His Thr Trp Val Ser Gly Lys Pro Ile Leu Cys Pro Ile Met His Cys
 165 170 175
 Asn Lys Glu Phe Asp Asn Gly His Leu Leu Leu Gly His Leu Lys Arg
 180 185 190
 Phe Asp His Ser Pro Cys Asp Pro Thr Ile Thr Leu His Gly Pro Phe
 195 200 205
 Phe Ser Ser Phe Ala Cys Val Val Cys Tyr Lys Lys Phe Val Thr Gln
 210 215 220
 Gln Gln Tyr Arg Asp His Leu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Asp Asp Gly
 225 230 235 240
 His Asn Asn Asn Leu Leu Pro Gln Ile Ile Gln Cys Phe Ala Cys Pro
 245 250 255
 Asn Cys Phe Leu Leu Phe Ser Arg Lys Glu Glu Cys Ser Lys His Met
 260 265 270
 Ser Gly Lys Asn His Phe His Gln Ser Phe Lys Leu Gly Asp Asn Lys
 275 280 285
 Gly Ile Ala His Pro Ile Ser Phe Pro Ser Phe Ala Lys Lys Leu Leu
 290 295 300
 Ile Ser Leu Cys Lys Asp Val Pro Phe Gln Val Lys Cys Val Ala Cys
 305 310 315 320
 His Lys Thr Leu Arg Ser His Met Glu Leu Thr Ala His Phe Arg Val
 325 330 335
 His Cys Arg Asn Ala Gly Pro Val Ala Val Ala Glu Lys Ser Ile Thr
 340 345 350

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Gln Val Ala Glu Lys Phe Ile Leu Arg Gly Tyr Cys Pro Asp Cys Asn
 355 360 365
 Gln Val Phe Val Asp Glu Thr Ser Thr Gln Asn His Lys Gln Asn Ser
 370 375 380
 Gly His Lys Val Arg Val Ile Asn Ser Val Glu Glu Ser Val Leu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Cys His Ser Ser Glu Gly Asn Lys Asp Pro Ser Ser Asp Leu His
 405 410 415
 Leu Leu Leu Asp Gln Ser Lys Phe Ser Ser Leu Lys Arg Thr Met Ser
 420 425 430
 Ile Lys Glu Ser Ser Ser Leu Glu Cys Ile Ala Ile Pro Lys Lys Lys
 435 440 445
 Met Asn Leu Lys Asp Lys Ser His Glu Gly Val Ala Cys Val Gln Lys
 450 455 460
 Glu Lys Ser Val Val Lys Thr Trp Phe Cys Glu Cys Asn Gln Arg Phe
 465 470 475 480
 Pro Ser Glu Asp Ala Val Glu Lys His Val Phe Ser Ala Asn Thr Met
 485 490 495
 Gly Tyr Lys Cys Val Val Cys Gly Lys Val Cys Asp Asp Ser Gly Val
 500 505 510
 Ile Arg Leu His Met Ser Arg Ile His Gly Gly Ala His Leu Asn Asn
 515 520 525
 Phe Leu Phe Trp Cys Arg Thr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Lys Asp
 530 535 540
 Thr Ile Met Ala His Val Thr Glu Phe His Asn Gly His Arg Tyr Phe
 545 550 555 560
 Tyr Glu Met Asp Glu Val Glu Gly Glu Thr Leu Pro Ser Ser Ser Thr
 565 570 575
 Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala Asn Lys Pro Ser Ser Ala Ile Thr Val
 580 585 590
 Ile Asp His Ser Pro Ala Asn Ser Ser Pro Arg Gly Lys Trp Gln Cys
 595 600 605

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Arg Ile Cys Glu Asp Met Phe Asp Ser Gln Glu Tyr Val Lys Gln His
 610 615 620
 Cys Met Ser Leu Ala Ser His Lys Phe His Arg Tyr Ser Cys Ala His
 625 630 635 640
 Cys Arg Lys Pro Phe His Lys Ile Glu Thr Leu Tyr Arg His Cys Gln
 645 650 655
 Asp Glu His Asp Asn Glu Ile Lys Ile Lys Tyr Phe Cys Gly Leu Cys
 660 665 670
 Asp Leu Ile Phe Asn Val Glu Glu Ala Phe Leu Ser His Tyr Glu Glu
 675 680 685
 His His Ser Ile Asp Tyr Val Phe Val Ser Glu Lys Thr Glu Thr Ser
 690 695 700
 Ile Lys Thr Glu Asp Asp Phe Pro Val Ile Glu Thr Ser Asn Gln Leu
 705 710 715 720
 Thr Cys Gly Cys Arg Glu Ser Tyr Ile Cys Lys Val Asn Arg Lys Glu
 725 730 735
 Asp Tyr Ser Arg Cys Leu Gln Ile Met Leu Asp Lys Gly Lys Leu Trp
 740 745 750
 Phe Arg Cys Ser Leu Cys Ser Ala Thr Ala Gln Asn Leu Thr Asp Met
 755 760 765
 Asn Thr His Ile His Gln Val His Lys Glu Lys Ser Asp Glu Glu Glu
 770 775 780
 Gln Gln Tyr Val Ile Lys Cys Gly Thr Cys Thr Lys Ala Phe His Asp
 785 790 795 800
 Pro Glu Ser Ala Gln Gln His Phe His Arg Lys His Cys Phe Leu Gln
 805 810 815
 Lys Pro Ser Val Ala His Phe Gly Ser Glu Lys Ser Asn Leu Tyr Lys
 820 825 830
 Phe Thr Ala Ser Ala Ser His Thr Glu Arg Lys Leu Lys Gln Ala Ile
 835 840 845
 Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Met Glu Lys Gly Val Glu Asn Asp Leu
 850 855 860

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

Ser Tyr Gln Asn Ile Glu Glu Glu Ile Val Glu Leu Pro Asp Leu Asp
 865 870 875 880
 Tyr Leu Arg Thr Met Thr His Ile Val Phe Val Asp Phe Asp Asn Trp
 885 890 895
 Ser Asn Phe Phe Gly His Leu Pro Gly His Leu Asn Gln Gly Thr Phe
 900 905 910
 Ile Trp Gly Phe Gln Gly Gly Asn Thr Asn Trp Lys Pro Pro Leu Asn
 915 920 925
 Cys Lys Ile Tyr Asn Tyr Leu Asn Arg Ile Gly Cys Phe Phe Leu His
 930 935 940
 Pro Arg Cys Ser Lys Arg Lys Asp Ala Ala Asp Phe Ala Ile Cys Met
 945 950 955 960
 His Ala Gly Arg Leu Asp Glu Gln Leu Pro Lys Gln Ile Pro Phe Thr
 965 970 975
 Ile Leu Ser Gly Asp Gln Gly Phe Leu Glu Leu Glu Asn Gln Phe Lys
 980 985 990
 Lys Thr Gln Arg Pro Ala His Ile Leu Asn Pro His His Leu Glu Gly
 995 1000 1005
 Asp Met Met Cys Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ser Asp Thr Thr Lys Glu
 1010 1015 1020
 Cys Asp Ser Asp Asp Asn Met Gly Ala Lys Asn Thr Ser Ile Gly Glu
 1025 1030 1035 1040
 Glu Phe Ile Ser Thr Glu Asp Val Glu Leu Glu Glu Ala Ile Arg Arg
 1045 1050 1055
 Ser Leu Glu Glu Met
 1060

<210> 12
 <211> 1061
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Gly Asp Pro Gly Ser Glu Ile Ile Glu Ser Val Pro Pro Ala Gly

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

1 5 10 15
 Pro Glu Ala Ser Glu Ser Thr Thr Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ile Gln
 20 25 30
 Phe Val Ser Glu Gly Pro Leu Arg Pro Val Leu Glu Tyr Ile Asp Leu
 35 40 45
 Val Ser Ser Asp Asp Glu Glu Pro Ser Thr Ser Tyr Thr Asp Glu Asn
 50 55 60
 Ile Lys Arg Lys Asp His Ile Asp Tyr Gln Lys Asp Lys Val Ala Leu
 65 70 75 80
 Thr Leu Ala Arg Leu Ala Arg His Val Glu Val Glu Lys Gln Gln Lys
 85 90 95
 Glu Glu Lys Asn Arg Ala Phe Arg Glu Lys Ile Asp Phe Gln His Ala
 100 105 110
 His Gly Leu Gln Glu Leu Glu Phe Ile Arg Gly His Ser Asp Thr Glu
 115 120 125
 Ala Ala Arg Leu Cys Val Asp Gln Trp Leu Lys Met Pro Gly Leu Lys
 130 135 140
 Thr Gly Thr Ile Asn Cys Gly Thr Lys Ser Ser Phe Arg Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 His Thr Trp Val Ser Gly Lys Pro Thr Leu Cys Pro Ile Met His Cys
 165 170 175
 Asn Lys Glu Phe Asp Asn Gly His Leu Leu Leu Gly His Leu Lys Arg
 180 185 190
 Phe Asp His Ser Pro Cys Asp Pro Thr Ile Thr Leu His Gly Pro Phe
 195 200 205
 Phe Ser Ser Phe Ala Cys Val Val Cys Tyr Lys Lys Phe Val Thr Gln
 210 215 220
 Gln Gln Tyr Arg Asp His Leu Phe Asp Lys Glu Ala Thr Asp Asp Gly
 225 230 235 240
 His Asn Asn Asn Leu Leu Pro Gln Ile Ile Gln Cys Phe Ala Cys Pro
 245 250 255
 Asn Cys Phe Leu Leu Phe Ser Arg Lys Glu Glu Cys Ser Lys His Met

WO 02/16426 PCT/EP01/09499

260 265 270

Ser Gly Lys Asn His Phe His Gln Ser Phe Lys Leu Gly Asp Asn Lys
275 280 285

Gly Ile Ala His Pro Ile Ser Phe Pro Ser Phe Ala Lys Lys Leu Leu
290 295 300

Ile Ser Leu Cys Lys Asp Val Pro Phe Gln Val Lys Cys Val Ala Cys
305 310 315 320

His Lys Thr Leu Arg Ser His Met Glu Leu Thr Ala His Phe Arg Val
325 330 335

His Cys Arg Asn Ala Gly Pro Val Ala Val Ala Glu Lys Ser Ile Thr
340 345 350

Gln Val Ala Glu Lys Phe Ile Leu Arg Gly Tyr Cys Pro Asp Cys Asn
355 360 365

Gln Val Phe Val Asp Glu Thr Ser Thr Gln Asn His Lys Gln Asn Ser
370 375 380

Gly His Lys Val Arg Val Ile Asn Ser Val Glu Glu Ser Val Leu Leu
385 390 395 400

Tyr Cys His Ser Ser Glu Gly Asn Lys Asp Pro Ser Ser Asp Leu His
405 410 415

Leu Leu Leu Asp Gln Ser Lys Phe Ser Ser Leu Lys Arg Thr Met Ser
420 425 430

Ile Lys Glu Ser Ser Ser Leu Glu Cys Ile Ala Ile Pro Lys Lys Lys
435 440 445

Met Asn Leu Lys Asp Lys Ser His Glu Gly Val Ala Cys Val Gln Lys
450 455 460

Glu Lys Ser Val Val Lys Thr Trp Phe Cys Glu Cys Asn Gln Arg Phe
465 470 475 480

Pro Ser Glu Asp Ala Val Glu Lys His Val Phe Ser Ala Asn Thr Met
485 490 495

Gly Tyr Lys Cys Val Val Cys Gly Lys Val Cys Asp Asp Ser Gly Val
500 505 510

Ile Arg Leu His Met Ser Arg Ile His Gly Gly Ala His Leu Asn Asn

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

515 520 525
 Phe Leu Phe Trp Cys Arg Thr Cys Lys Lys Glu Leu Thr Arg Lys Asp
 530 535 540
 Thr Ile Met Ala His Val Thr Glu Phe His Asn Gly His Arg Tyr Phe
 545 550 555 560
 Tyr Glu Met Asp Glu Val Glu Gly Glu Thr Leu Pro Ser Ser Ser Thr
 565 570 575
 Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala Asn Lys Pro Ser Ser Ala Ile Thr Val
 580 585 590
 Ile Asp His Ser Pro Ala Asn Ser Ser Pro Arg Gly Lys Trp Gln Cys
 595 600 605
 Arg Ile Cys Glu Asp Met Phe Asp Ser Gln Glu Tyr Val Lys Gln His
 610 615 620
 Cys Met Ser Leu Ala Ser His Lys Phe His Arg Tyr Ser Cys Ala His
 625 630 635 640
 Cys Arg Lys Pro Phe His Lys Ile Glu Thr Leu Tyr Arg His Cys Gln
 645 650 655
 Asp Glu His Asp Asn Glu Ile Lys Ile Lys Tyr Phe Cys Gly Leu Cys
 660 665 670
 Asp Leu Ile Phe Asn Val Glu Glu Ala Phe Leu Ser His Tyr Glu Glu
 675 680 685
 His His Ser Ile Asp Tyr Val Phe Val Ser Glu Lys Thr Glu Thr Ser
 690 695 700
 Ile Lys Thr Glu Asp Asp Phe Pro Val Ile Glu Thr Ser Asn Gln Leu
 705 710 715 720
 Thr Cys Gly Cys Arg Glu Ser Tyr Ile Cys Lys Val Asn Arg Lys Glu
 725 730 735
 Asp Tyr Ser Arg Cys Leu Gln Ile Met Leu Asp Lys Gly Lys Leu Trp
 740 745 750
 Phe Arg Cys Ser Leu Cys Ser Ala Thr Ala Gln Asn Leu Thr Asp Met
 755 760 765
 Asn Thr His Ile His Gln Val His Lys Glu Lys Ser Asp Glu Glu Glu

WO 02/16426

PCT/EP01/09499

```

770              775              780
Gln Gln Tyr Val Ile Lys Cys Gly Thr Cys Thr Lys Ala Phe His Asp
785              790              795              800
Pro Glu Ser Ala Gln Gln His Phe His Arg Lys His Cys Phe Leu Gln
805              810              815
Lys Pro Ser Val Ala His Phe Gly Ser Glu Lys Ser Asn Leu Tyr Lys
820              825              830
Phe Thr Ala Ser Ala Ser His Thr Glu Arg Lys Leu Lys Gln Ala Ile
835              840              845
Asn Tyr Ser Lys Ser Leu Asp Met Glu Lys Gly Val Glu Asn Asp Leu
850              855              860
Ser Tyr Gln Asn Ile Glu Glu Glu Ile Val Glu Leu Pro Asp Leu Asp
865              870              875              880
Tyr Leu Arg Thr Met Thr His Ile Val Phe Val Asp Phe Asp Asn Trp
885              890              895
Ser Asn Phe Phe Gly His Leu Pro Gly His Leu Asn Gln Gly Thr Phe
900              905              910
Ile Trp Gly Phe Gln Gly Gly Asn Thr Asn Trp Lys Pro Pro Leu Asn
915              920              925
Cys Lys Ile Tyr Asn Tyr Leu Asn Arg Ile Gly Cys Phe Phe Leu His
930              935              940
Pro Arg Cys Ser Lys Arg Lys Asp Ala Ala Asp Phe Ala Ile Cys Met
945              950              955              960
His Ala Gly Arg Leu Asp Glu Gln Leu Pro Lys Gln Ile Pro Phe Thr
965              970              975
Ile Leu Ser Gly Asp Gln Gly Phe Leu Glu Leu Glu Asn Gln Phe Lys
980              985              990
Lys Thr Gln Arg Pro Ala His Ile Leu Asn Pro His His Leu Glu Gly
995              1000              1005
Asp Met Met Cys Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ser Asp Thr Thr Lys Glu
1010              1015              1020
Cys Asp Ser Asp Asp Asn Met Gly Ala Lys Asn Thr Ser Ile Gly Glu

```

WO 02/16426 PCT/EP01/09499

1025 1030 1035 1040

Glu Phe Ile Ser Thr Glu Asp Val Glu Leu Glu Glu Ala Ile Arg Arg
1045 1050 1055

Ser Leu Glu Glu Met
1060

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
atgggagacc cgggtcgga 19

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
ttacatttcc tcaagacttc 20

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 15
ctaggtaccg gacagcagga gcagtggtgc 30

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 16

WO 02/16426

ggcagtgagc tccatgtggg

PCT/EP01/09499

20

【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
28 February 2002 (28.02.2002)

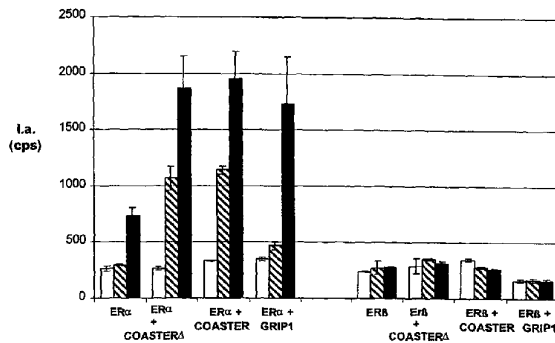
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/016426 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/74
- (21) International Application Number: PCT/EP01/09499
- (22) International Filing Date: 16 August 2001 (16.08.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
00202905.6 21 August 2000 (21.08.2000) EP
01201771.1 14 May 2001 (14.05.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): AKZO NOBEL N.V. [NL/NL]; Velperweg 76, NL-6824 BM Arnhem (NL).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): DECHERING, Koen, Jacob [NL/NL]; Haterseveldweg 258, NL-6532
- (74) Agent: KRAAK, Hajo; Patent Department Organon, P.O. Box 20, Wehhouder van Fischstraat 1, NL-5340 BH Oss (NL).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: COASTER, A HUMAN COACTIVATOR OF STEROID RECEPTORS



(57) Abstract: The invention provides a protein having an amino acid sequence as in SEQ ID 7, 8, 11 or 12, similar proteins, naturally occurring variants and homologous functional equivalents thereof, as well as the use of a polynucleotide encoding such protein, for use in an assay and for use in a method of modulation of transcriptional activity promoted by a responsive nuclear receptor and a coactivator, which coactivator is the mentioned protein and is named COASTER, and which nuclear receptor is preferably a steroid receptor.

WO 02/016426 A3

WO 02/016426 A3



Published:
— with international search 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.

(88) Date of publication of the international search report:
29 August 2002

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09499
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12Q1/68 G01N33/74		
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) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
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 practical, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE, T. ET AL.: "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. IX. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Can Code for Large Proteins in vitro" DNA RESEARCH, vol. 5, no. 1, 28 February 1998 (1998-02-28), pages 31-39, XP000878819	1,11
Y	cited in the application abstract clone ID NO: KIAA0576 page 33; figure 1 page 34; table 1 page 35; table 2 page 38; figure 3	2-10
X	-& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] 1 November 1999 (1999-11-01) NAGASE, T. ET AL.: "KIAA0576 Protein -/--	1
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts 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 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 May 2002		10 June 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentaan 2 NL - 2280 LV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Fuchs, U

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/09499

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(DJ41711.1) (FRAGMENT)* retrieved from HOMO SAPIENS Database accession no. Q9Y4E5 XP002200492 the whole document ---	2-11
X	WO 98 30582 A (GENETICS INSTITUTE, INC.) 16 July 1998 (1998-07-16)	1,11
A	clone BP101_2 abstract page 5, line 6 -page 6, line 12 page 19, line 14 -page 20, line 13 page 28, line 1 -page 32, line 13 page 35, line 1 -page 36, line 8 SEQ ID NO: 6 page 66 -page 67 SEQ ID NO: 28 page 85 -page 87 page 91; claims 17,18 ---	2-10
Y	WO 97 10337 A (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 20 March 1997 (1997-03-20)	2-10
A	abstract page 5, line 10 -page 7, line 19 page 13, line 3 -page 20, line 28 page 21, line 20 -page 29, line 13 page 31, line 9 -page 46, line 7 page 58, line 1 -page 69, line 4 page 74, line 20 -page 80, line 25 page 83, line 17 -page 85, line 27 page 88, line 1 -page 89, line 2 page 89 -page 92; examples 1,2 page 94 -page 101; examples 4-8 page 102 -page 106; claims 7-30 --- -/--	1,11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09499
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 1 074 617 A (HELIX RESEARCH INSTITUTE) 7 February 2001 (2001-02-07) clones HEMBA1002935 and PLACE1005055 abstract page 13; table 1 page 102; table 1 page 138, line 38 page 142, line 39 page 143, line 35 page 153, line 19 page 160, line 48 page 164, line 43 page 433; table 23 page 547; table 137 SEQ ID NO: 10701 page 979; table 350 SEQ ID NO: 18824 page 1102; table 350 page 1531, line 9 page 1560, line 35 page 1566, line 1 page 1566, line 55 page 1594, line 15 - line 16 page 1766, line 40 page 1883, line 8 page 1924, line 51 - line 52 page 2066, line 45 - line 46 page 2153, line 32 - line 33 page 2184, line 19 page 2279, line 31 page 2397, line 27 - line 28 page 2494, -page 2534; claims 8-22 -& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] EP1074617, 26 June 2001 (2001-06-26) "Human protein sequence SEQ ID NO: 10701" Database accession no. AAB92536 XP002200493 the whole document -& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] EP1074617, 26 June 2001 (2001-06-26) "Human protein sequence SEQ ID NO: 18824" Database accession no. AAB95820 XP002200494 the whole document	1,11
A	MEIJER, O.C. ET AL.: "Differential Expression and Regional Distribution of Steroid Receptor Coactivators SRC-1 and SRC-2 in Brain and Pituitary" ENDOCRINOLOGY, vol. 141, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 2192-2199, XP008000391 the whole document	1-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/09499
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DECHERING, K. ET AL.: " Estrogen Receptors alpha and beta: Two Receptors of a Kind?" CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 7, no. 5, May 2000 (2000-05), pages 561-576, XP001070314 cited in the application the whole document	1-11
A	GLASS, C.K. ET AL.: "Nuclear receptor coactivators" CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 9, no. 2, April 1997 (1997-04), pages 222-232, XP002045759 the whole document	1-11
A	WO 99 64596 A (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 16 December 1999 (1999-12-16) abstract page 1, line 11 -page 3, line 3 protein PRGE-31 page 3, line 34 -page 7, line 7 page 15, line 21 -page 42, line 1 page 58; table 1 page 66; table 2 page 69; table 3 page 77; table 4 page 80 -page 81; claims 1-20 SEQ ID NO: 31 page 119 -page 120	1-11
E	WO 01 75067 A (HYSEQ, INC.) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document -& DATABASE EMBL, HEIDELBERG, FRG [Online] W00175067, 18 February 2002 (2002-02-18) "Novel human diagnostic protein #17121" Database accession no. AB617130 XP002200495 the whole document	1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/09499
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	☒	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/EP 01/09499

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 8, as well as claims 6 and 9 (as far as in vivo methods are concerned) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claim 11 (as far as in vivo methods are concerned) is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Present claims 6-10 relate to an agent defined by reference to a desirable characteristic or property, namely which interferes with, .. enhances, the function of the coactivator.

The claims cover all agents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such agents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the agent by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the vector inserting the gene for the coactivator into cells as mentioned in the description, page 7, line 30 - page 8, line 3 and page 8, line 36 - page 9, line 11.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 01/09499

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9830582	A	16-07-1998	AU 5913898 A AU 5958698 A EP 0970108 A2 EP 0996721 A2 JP 2001508299 T JP 2001509153 T WO 9830582 A2 WO 9830584 A2	03-08-1998 03-08-1998 12-01-2000 03-05-2000 26-06-2001 10-07-2001 16-07-1998 16-07-1998
WO 9710337	A	20-03-1997	AU 725399 B2 AU 7103896 A EP 0871729 A1 JP 11511328 T WO 9710337 A1 US 6380373 B1	12-10-2000 01-04-1997 21-10-1998 05-10-1999 20-03-1997 30-04-2002
EP 1074617	A	07-02-2001	AU 6180800 A AU 6180900 A AU 6181000 A AU 6181100 A AU 6181200 A AU 6181300 A AU 6181400 A AU 6181500 A AU 6181600 A AU 6315800 A EP 1074617 A2 EP 1205549 A1 WO 0109315 A1 WO 0109345 A1 WO 0109316 A1 WO 0109349 A1 WO 0109317 A1 WO 0109318 A1 WO 0109319 A1 WO 0109346 A1 WO 0109320 A1 WO 0109321 A1 WO 0109322 A1 WO 0109323 A1	19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 19-02-2001 07-02-2001 15-05-2002 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 08-02-2001
WO 9964596	A	16-12-1999	AU 4438899 A CA 2329685 A1 EP 1086219 A2 WO 9964596 A2	30-12-1999 16-12-1999 28-03-2001 16-12-1999
WO 0175067	A	11-10-2001	AU 3486501 A AU 3995501 A AU 4925101 A AU 4972801 A AU 5119401 A AU 5521401 A WO 0157266 A1 WO 0164839 A2 WO 0175067 A2 WO 0175064 A2 WO 0174836 A1 WO 0175093 A1	14-08-2001 12-09-2001 15-10-2001 15-10-2001 15-10-2001 15-10-2001 09-08-2001 07-09-2001 11-10-2001 11-10-2001 11-10-2001 11-10-2001

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 15/16	A 6 1 P 15/16	
A 6 1 P 15/18	A 6 1 P 15/18	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	Z N A
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 デチエリング, クーン・ヤコブ
オランダ国、エヌ・エルー 6 5 3 2 ・イクス・ウエー・ナイメーヘン、ハテルトセフェルドウエヒ
・ 2 5 8

(72)発明者 モセルマン, シーツエ
オランダ国、エヌ・エルー 5 3 4 6 ・フエー・エム・オツス、デ・エデレンブルフ・ 3 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04
GA11 HA12
4B063 QA18 QA19 QA20 QQ08 QQ43 QR08 QR41 QR42 QR56 QS25
QS34 QX02
4C087 AA01 AA02 BB63 NA14 ZA36 ZA81 ZB26
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA50 FA74